

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Mai 2004 (21.05.2004)

PCT

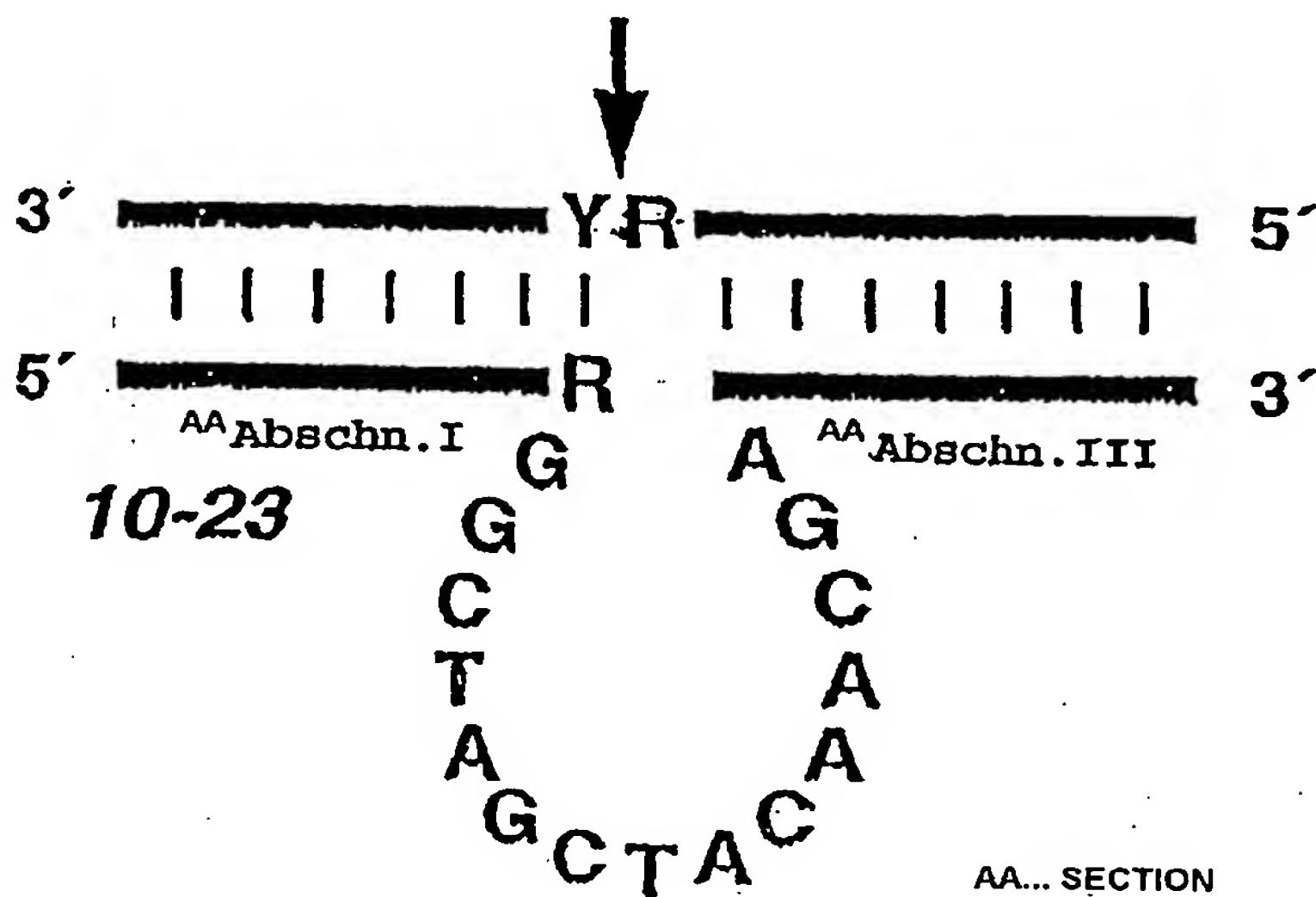
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/042046 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/012413  
(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. November 2003 (06.11.2003)  
(25) Einreichungssprache: Deutsch  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
(30) Angaben zur Priorität:  
102 51 682.0 6. November 2002 (06.11.2002) DE  
103 22 662.1 15. Mai 2003 (15.05.2003) DE  
(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): GRÜNENTHAL GMBH [DE/DE]; Zieglerstr. 6, 52978 Aachen (DE).  
(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHUBERT, Steffen
- [DE/DE]; Seelingstr. 33, 14059 Berlin (DE). KURRECK, Jens [DE/DE]; Köhlerstr. 12 B, 12205 Berlin (DE). GRÜNWELLER, Arnold [DE/DE]; Schützenstr. 7, 12165 Berlin (DE). ERDMANN, Volker [DE/DE]; Argentinische Allee 2, 14163 Berlin (DE).  
(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Flüggenstr. 13, 80639 München (DE).  
(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.  
(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: EFFECTIVE AND STABLE DNA ENZYMES

(54) Bezeichnung: WIRKSAME UND STABILE DNA-ENZYME



(57) Abstract: The invention relates to DNA enzymes of type 10-23, which are particularly stable as a result of modifications to particular nucleotides in the core sequence and furthermore have an essentially similar or improved cleaving efficiency for the substrate thereof, relative to the unmodified DNA enzyme. The invention further relates to host cells, containing said DNA enzymes. A medicament is also prepared which contains said DNA enzymes or said host cells. The DNA enzyme and further inventions are particularly targeted at the vanilloid receptor 1 (VR1) or picorna viruses. Small interference RNA molecules (siRNA) are also disclosed, targeted at VR1 and the host cells containing the siRNA. The siRNA and corresponding host cells are suitable as medicaments or for the production of medicaments, in particular for the treatment of pain and other disease states associated with VR1.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/042046 A2

BEST AVAILABLE COPY



ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

---

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Enzyme vom Typ 10-23, die durch Modifizierung bestimmter Nukleotide in der Kernsequenz besonders stabil sind und darüber hinaus im wesentlichen die gleiche oder eine höhere Spalteffizienz gegenüber ihrem Substrat aufweisen, wie die entsprechenden nicht-modifizierten DNA-Enzyme. Weitere Gegenstände der vorliegenden Anmeldung betreffen Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme enthalten. Darüber hinaus wird ein Arzneimittel bereitgestellt, welches die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme bzw. Wirtszellen enthalten. Die DNA-Enzyme und weiteren Gegenstände sind insbesondere gegen den Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) bzw. Picornaviren gerichtet. Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind kleine Interferenz-RNA-Moleküle (siRNA), die gegen VR1 gerichtet sind, und die siRNA enthaltende Wirtszellen. Die siRNA und entsprechende Wirtszellen eignen sich als Arzneimittel bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Schmerzen und anderen mit VR1 zusammenhängenden krankhaften Zuständen.

Anmelder:  
Grünenthal GmbH

5

10

## Wirksame und stabile DNA-Enzyme

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Enzyme vom Typ 10-23, die durch Modifizierung bestimmter Nukleotide in der Kernsequenz besonders stabil sind und darüber hinaus im wesentlichen die gleiche oder eine höhere Spalteffizienz gegenüber ihrem Substrat aufweisen, wie die entsprechenden nicht-modifizierten DNA-Enzyme. Weitere Gegenstände der vorliegenden Anmeldung betreffen Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme enthalten. Darüber hinaus wird ein Arzneimittel bereitgestellt, welches die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme bzw. Wirtszellen enthalten. Die DNA-Enzyme und weiteren Gegenstände sind insbesondere gegen den Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) bzw. Picornaviren gerichtet. Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind kleine Interferenz-RNA-Moleküle (siRNA), die gegen VR1 gerichtet sind, und die siRNA enthaltende Wirtszellen. Die siRNA und entsprechende Wirtszellen eignen sich als Arzneimittel bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Schmerzen und anderen mit VR1 zusammenhängenden krankhaften Zuständen.

RNA-spaltende DNA-Enzyme wurden ausgehend von Hammerhead-Ribozymen durch *in vitro* Selektionsexperimente entwickelt. Im Vergleich zu RNA-Spezies sind DNA-Enzyme leichter herzustellen, und sie sind, insbesondere in biologischen Geweben, stabiler. Das im Stand der Technik bekannte DNA-Enzym mit der größten Spalteffizienz und der flexibelsten Substraterkennung ist das sogenannte DNA-Enzym vom Typ "10-23" (Santoro und Joice (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4262-4266). Das DNA-Enzym vom Typ 10-23 enthält eine katalytische

Domäne (Kernsequenz) von 15 Nukleotiden, welche von zwei Substraterkennungsdomänen oder -armen, die jeweils 7-10 Nukleotide umfassen, flankiert wird (vgl. Fig. 1). Das DNA-Enzym vom Typ 10-23 bindet das RNA-Substrat durch Basenpaarung gemäß den Watson-Crick-Regeln über die Substraterkennungsarme.

5

Trotz der höheren Stabilität von DNA-Enzymen im Vergleich zu Ribozymen ist es insbesondere für *in vivo* Anwendungen, bspw. als Arzneimittel, erforderlich, diese Moleküle gegenüber nukleolytischen Angriffen zu stabilisieren.

10 Daher liegt der vorliegenden Erfindung zum einen die Aufgabe zugrunde, DNA-Enzyme vom Typ 10-23 bereitzustellen, die eine größere Stabilität gegenüber nukleolytischem Abbau aufweisen, wobei die katalytische Aktivität gegenüber dem jeweiligen RNA-Substrat im wesentlichen derjenigen des nicht-stabilisierten DNA-Enzyms entspricht, vorzugsweise höher ist.

15

Die effektive Behandlung von Schmerz ist eine große Herausforderung für die molekulare Medizin. Akuter und transitorischer Schmerz ist ein wichtiges Signal des Körpers, um den Menschen vor schwerem Schaden durch Umgebungseinflüsse oder eine Überlastung des Körpers zu schützen. Im Gegensatz dazu hat 20 der chronische Schmerz, der länger anhält als die Ursache des Schmerzes und der erwartungsgemäße Zeitrahmen der Heilung, keine bekannte biologische Funktion. Vom chronischen Schmerz sind Hunderte von Millionen Menschen weltweit betroffen. Etwa 7,5 Millionen Menschen leiden allein in der Bundesrepublik Deutschland an chronischen Schmerzen. Die pharmakologische Behandlung, 25 insbesondere des chronischen Schmerzes, ist derzeit unbefriedigend. Die im Stand der Technik bekannten Analgetika sind häufig nicht ausreichend wirksam und haben zum Teil schwere Nebenwirkungen.

Daher werden vielfach neue Targets, körpereigene Strukturen, über die eine 30 schmerzmodulierende Einwirkung, bspw. niedermolekularer Wirkstoffe oder anderer Verbindungen wie Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (ODN), möglich erscheint, für die Behandlung, insbesondere chronischer Schmerzen gesucht. Der

von Caterina et al. (1997) Nature 389: 816-824, klonierte Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) (auch als Capsaicin-Rezeptor bezeichnet) ist ein vielversprechender Anhaltspunkt für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente. Es handelt sich bei diesem Rezeptor um einen Kationenkanal, der vorwiegend von primären sensorischen Neuronen exprimiert wird (Caterina et al. (1997), *supra*). Der VR1 wird durch Capsaicin, eine Komponente der Chilischoten, Hitze (> 43°C) und einem niedrigen pH-Wert (d.h. Protonen) infolge von Gewebeverletzungen aktiviert und bewirkt einen Calcium-Einstrom in primäre afferente Neuronen. VR1-Knockout-Mäuse entwickeln keine thermische Hyperalgesie nach Gewebeschäden bzw. Entzündungen (Caterina et al. (2000) Science 288: 306-313; Davis et al. (2000) Nature 405: 183-187).

In WO 02/18407 sind Antisense-ODN und ebenfalls unter diesem Begriff subsummierte DNA-Enzyme vom Typ 10-23 offenbart, welche zur Spaltung der VR1-mRNA führen.

Daher liegt der vorliegenden Erfindung weiterhin die Aufgabe zugrunde, DNA-Enzyme vom Typ 10-23 bereitzustellen, die gegen die mRNA des VR1-Rezeptors gerichtet sind und eine größere Stabilität als die im Stand der Technik offenbarten ODN bei vergleichbarer oder höherer katalytischer Aktivität aufweisen.

Zu den Picornaviren gehören epidemiologisch bedeutsame Krankheitserreger, wie Rhinoviren, zahlreiche Enteroviren (u.a. Echoviren, die drei Polioviren, verschiedene Coxsackieviren), die unterschiedliche Krankheiten, insbesondere beim Menschen auslösen, wie Schnupfen (akute Rhinitis) oder schwerwiegenderen chronischen Entzündungen des Nasen-Rachenraums (Rhinopathien), Kinderlähmung entzündliche Herzerkrankungen, virale Meningitis usw.. Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, besonders wirksame und stabile DNA-Enzyme vom Typ 10-23 gegen Picornaviren bereitzustellen.

30

Während der letzten Jahre hat sich vor allem die *in vitro* die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) bei einigen Anwendungen als wirksamer Mechanismus zur

Ausschaltung von Genen erwiesen. Die RNA-Interferenz beruht auf doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA), welche die sequenzspezifische Suppression der Genexpression auslösen (Zamore (2001) *Nat. Struct. Biol.* 9: 746-750; Sharp (2001) *Genes Dev.* 5: 485-490; Hannon (2002) *Nature* 41: 244-251). Allerdings

5 bewirkte die Transfektion von Säugerzellen mit langer dsRNA eine Interferon-Antwort durch Aktivierung von Proteinkinase R und RNaseL (Stark et al. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264; He und Katze (2002) *Viral Immunol.* 15: 95-119). Diese unspezifischen Effekte werden bei Verwendung von kürzerer, bspw. 10 21- bis 23-merer, sog. siRNA (engl. „small interfering RNA“) umgangen, da unspezifische Effekte durch dsRNA, die kürzer als 30 Bp ist, nicht ausgelöst werden (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411: 494-498). Kürzlich wurden siRNA-Moleküle auch *in vivo* zur Anwendung gebracht (McCaffrey et al. (2002) *Nature* 418: 38-39; Xia et al. (2002) *Nature Biotech.* 20: 1006-1010; Brummelkamp et al. (2002) *Cancer Cell* 2: 243-247).

15

Somit liegt der vorliegenden Erfindung weiterhin die Aufgabe zugrunde, siRNA-Moleküle bereitzustellen, die eine wirksame Behandlung von mit VR1 zusammenhängenden krankhaften Zuständen, insbesondere Schmerzen, ermöglichen.

20 Die vorstehend genannten Aufgaben werden durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

Insbesondere wird ein DNA-Enzym vom Typ 10-23 (im folgenden als "DNA-Enzym" bezeichnet) bereitgestellt, umfassend von 5' nach 3' einen ersten Substraterkennungsarm (im folgenden "Abschnitt I"), eine katalytische Kernsequenz (im folgenden "Abschnitt II") und einen zweiten Substraterkennungsarm (im folgenden "Abschnitt III"), wobei eines oder mehrere der Nukleotide 2, 7, 8 11, 14 und 15 des Abschnitts II (der vorzugsweise insgesamt 15 Nukleotide enthält) modifiziert ist/sind.

30

Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß in geeigneter Weise chemisch modifizierte Nukleotide in DNA-Enzyme, insbesonde-

- re solche gegen VR1 oder Picornaviren, in der Kernsequenz an den Positionen 2, 7, 8, 11, 14 und/oder 15 eingeführt werden können sowie, wie nachstehend weiter dargelegt, auch in den Substraterkennungsarmen (Abschnitte I und III), gegebenenfalls unter Anpassung der Länge dieser Substraterkennungsarme, eingeführt 5 werden können, um so stabilisierte DNA-Enzyme zu erhalten, die keine signifikante Verminderung der katalytischen Aktivität oder sogar eine verbesserte katalytische Aktivität gegenüber dem jeweiligen RNA-Substrat aufweisen.
- Der Begriff "modifiziertes Nukleotid" bedeutet erfindungsgemäß, daß das jeweilige 10 Nukleotid chemisch modifiziert ist. Ein Fachmann versteht unter dem Begriff "chemische Modifikation", daß das modifizierte Nukleotid durch Ersetzen, Anfügen oder Entfernen einzelner oder mehrerer Atome oder Atomgruppen im Vergleich zu natürlich vorkommenden Nukleotiden verändert ist. Daher kann die chemische Modifikation eines Nukleotids erfindungsgemäß die Ribose (z.B. 2'-O- 15 Methyl-Ribonukleotide, sog. "Locked Nucleic Acid" (LNA)-Ribonukleotide und invertiertes Thymidin), die Phosphor(di)ester-Bindung (z.B. Phosphorthioate, Phosphoramidate, Methylphosphonate und Peptidnukleotide) und/oder die Base (z.B. 7-Deazaguanosin, 5-Methylcytosin und Inosin) betreffen.
- 20 Bevorzugte modifizierte Nukleotide gemäß der vorliegenden Erfindung sind bspw. Phosphorthioat-Nukleotide, invertiertes Thymidin, 2'-O-Methyl-Ribonukleotide und LNA-Ribonukleotide. Diese erfindungsgemäßen Modifikationen sind beispielhaft in der Fig. 2 dargestellt.
- 25 Wie in der Fig. 2 gezeigt, sind LNA Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide, die eine Methylen-Brücke enthalten, welche den 2'-Sauerstoff der Ribose mit dem 4'-Kohlenstoff verbindet. Einen Überblick über LNA geben z.B. Braasch und Corey (2001) in Chem. Biol. 8: 1-7. Dieser Artikel ist ausdrücklich Mitbestandteil der vorliegenden Offenbarung. LNA sind im Handel bspw. von der Fa. Proligo, Boulder, 30 CO, USA, erhältlich. Phosphorthioate können bspw. über MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland, bezogen werden. 2'-O-Methyl-modifizierte Ribonukleotide sind u.a. bei IBA-NAPS, Göttingen, Deutschland, erhältlich.

Bei bevorzugten DNA-Enzymen der vorliegenden Erfindung sind alle der Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 des Abschnitts II (Kernsequenz) modifiziert.

- 5 Einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung bilden DNA-Enzyme, bei denen eines oder mehrere der Nukleotide der Substraterkennungsdomänen (bzw. Substraterkennungsarme), also des Abschnitts I und/oder des Abschnitts III modifiziert, insbesondere durch Phosphorthioat, invertiertes Thymidin, 2'-O-Methyl-Ribose oder LNA-Ribonukleotide, ist bzw. sind. Bevorzugte Ausführungsformen  
10 der vorliegenden Erfindung sind DNA-Enzyme, bei denen die Modifikationen der obigen Definition im Abschnitt II (katalytische Kernsequenz) und in den Abschnitten I und/oder II vorliegen.

Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßigen DNA-  
15 Enzyms sind alle Nukleotide des Abschnitts I und/oder III, insbesondere alle Nukleotide beider Abschnitte, modifiziert, wobei es weiter bevorzugt ist, wenn dabei alle Nukleotide Phosphorthioat- oder 2'-O-Methyl-Ribose-modifiziert sind.

Des weiteren sind vorzugsweise mehr als 3, insbesondere 3 bis 7, mehr bevorzugt 3 bis 6, insbesondere 3 bis 5 Nukleotide des Abschnitts I und/oder des Abschnitts 3, vorzugsweise beider Abschnitte, modifiziert. Dabei ergeben sich besonders bevorzugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßigen DNA-Enzyms, wenn sich die modifizierten Nukleotide am 5'-Ende des Abschnitts I und/oder am 3'-Ende des Abschnitts III, d.h. an den Enden des DNA-Enzyms, befinden. Hierbei sind die modifizierten Nukleotide vorzugsweise 2'-O-Methyl- oder LNA-Ribonukleotide.  
25

2'-O-Methyl- und LNA-Ribonukleotide sind besonders bevorzugte Modifikationen gemäß der vorliegenden Erfindung, da diese Nukleotide eine höhere Affinität des DNA-Enzyms zum Substrat bewirken. Insbesondere bei Substratüberschuss (d.h. sog. "Multiple Turnover"-Bedingungen), wie sie für die Wirksamkeit des erfindungsgemäßigen DNA-Enzyms unter *in vivo* Bedingungen anzutreffen sind, sollte  
30

die Affinität des Enzyms zum Substrat nicht zu hoch sein, da sonst die Produktfreisetzung die Kinetik bestimmt. Ein Maß für die Affinität des erfindungsgemäßen DNA-Enzyms ist sein Schmelzpunkt mit dem Substrat. Erfindungsgemäß wurde diesbezüglich festgestellt, daß ein Geschwindigkeitsoptimum beobachtet wird,  
5 welches z.B. bei gegen VR1 und Rhinovirus 14 gerichtete DNA-Enzymen etwas oberhalb der Reaktionstemperatur (37°C) liegt. Daher ergeben sich erfindungsgemäß besonders bevorzugte Ausgestaltungen des DNA-Enzyms, wenn bei einem gegebenen Ziel-Molekül die Schmelztemperatur durch Variation der modifizierten Nukleotide, der Art der Modifikation und/oder der Länge der Substraterkennungsarme (Abschnitte I und III) entsprechend eingestellt wird. Vorzugsweise beträgt die Schmelztemperatur der zwischen den Abschnitten I und III des erfindungsgemäßen DNA-Enzyms und den entsprechenden Targetsequenzen gebildeten Doppelstrände etwa 33 bis etwa 45°C, mehr bevorzugt etwa 35 bis etwa 10 42°C, insbesondere etwa 37 bis etwa 40°C, besonders etwa 39°C.

15

Dabei wurde insbesondere festgestellt, daß sich bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen DNA-Enzyms ergeben, wenn der Abschnitt I und/oder der Abschnitt III, insbesondere beide Abschnitte, nicht mehr als 9, mehr bevorzugt nicht mehr als 8, insbesondere 7, Nukleotide umfassen.

20

Ganz besonders bevorzugte DNA-Enzyme der vorliegenden Erfindung sind Spezies mit folgenden Längen der Substraterkennungsarme und den folgenden Modifikationen, wobei die erste Zahl die Länge der Substraterkennungsarme und die zweite Zahl die Anzahl der modifizierten Nukleotide, die sich bevorzugt am Ende  
25 der Arme befinden, anzeigt und OMe 2'-O-Methyl-Ribonukleotide und LH LNA-Ribonukleotide kennzeichnen:

OMe9-4, OMe8-4, OMe7-3, OMe7-4, OMe7-5, OMe7-6, OMe7-7, OMe6-5, LH9-4, LH7-3 und LH7-4.

30

Die Basensequenz der katalytisch aktiven Kerndomäne des DNA-Enzyms, welches von Santoro und Joyce (1997), *supra*, entwickelt wurde, ist von 5' nach 3'

GGCTAGCTACAAACGA ( vgl. Fig. 1). Erfindungsgemäß wurde weiter festgestellt, daß die Basen der Kernsequenz flexibel sind, insbesondere in den Positionen 7 bis 12, wobei das Thymidin an Position 8 sogar weggelassen werden kann. Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich, daß das erfindungsgemäße DNA-Enzym im Abschnitt II von 5' nach 3' die folgende Konsensussequenz aufweisen kann:  
5 GGMTMGH (N) DNNNMGD.

Dabei ist M = A oder C, H = A, C oder T, D = G, A oder T und N = irgendeine (natürlich vorkommende) Base. Basen bzw. Nukleotide in Klammern müssen nicht  
10 vorhanden sein.

Hinsichtlich des Substrats ist das erfindungsgemäße DNA-Enzym nicht eingeschränkt. Daher kann das DNA-Enzym grundsätzlich gegen sämtliche mRNA-Moleküle, andere RNA, wie virale RNA, Viroide usw. eingesetzt werden. Target-  
15 Sequenzen sind dabei solche, welche das Spaltmotiv der 10-23-DNA-Enzyme, nämlich ein Purin/Pyrimidin-Motiv, aufweisen. Bevorzugte Target-Sequenzen umfassen ein GU-Motiv, da GU-Sequenzen von DNA-Enzymen besonders effektiv gespalten werden.

20 Bevorzugt ist das erfindungsgemäße DNA-Enzym gegen die mRNA des Vanilloid-Rezeptors 1 (VR1), insbesondere von Säugern, wie Mensch, Affe, Hund, Katze, Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Rind, Schwein, Schaf und Ziege, gerichtet.

25 Spezifische Basensequenzen der Abschnitte I und III (von 5' nach 3') sind die folgenden, wobei gegebenenfalls auch eine in einem Nukleotid davon abweichende Sequenz möglich ist, mit der Maßgabe, daß sich das von den angegebenen Sequenzen abweichende Nukleotid nicht an einer der letzten drei Positionen des Abschnitts I und nicht an einer der ersten 3 Positionen des Abschnitts III befindet,  
30 sind folgende: (N = irgendeine Base bzw. irgendein Nukleotid)

Abschnitt I

Abschnitt III

	GTCATGA	GGTTAGG
	TGTCA TGCATGA	GGTTAGGG
	ATGTCATGA	GGTTAGGGG
	GTCGTGG	GATTAGG
5	TGTCGTGG	GATTAGG
	ATGTCGTGG	GATTAGG
	TTGTTGA	GGTCTCA
	CTTGTGA	GGTCTCAC
	TCTTGTGA	GGTCTCACC
10	TTGTTGA	AGTCTCA
	CTTGTGA	AGTCTCAN
	TCTTGTGA	AGTCTCANN
	GGCCTGA	CTCAGGG
	CGGCCTGA	CTCAGGGA
15	TCGGCCTGA	CTCAGGGAG
	TGCTTGA	CGCAGGG
	CTGCTTGA	CGCAGGGN
	TCTGCTTGA	CGCAGGGNN
	GTGTGGA	TCCATAG
20	GGTGTGGA	TCCATAGG
	TGGTGTGGA	TCCATAGGC
	ACGTGGA	TCAGACG
	GACGTGGA	TCAGACGN
	CGACGTGGA	TCAGACGN
25	GTGGGGA	TCAGACT
	GGTGGGGA	TCAGACTC
	GGGTGGGGA	TCAGACTCC
30	GTGGGTC	GCAGCAG
	AGTGGGTC	GCAGCAG
	GAGTGGGTC	GCAGCAG

	CGCTTGA	AAATCTG
	GCGCTTGA	AAATCTGT
	TGCGCTTGA	AAATCTGTC
	CGCTTGA	GAATCTG
5	GCGCTTGA	GAATCTGN
	TGCGCTTGA	GAATCTGNN
	CTCCAGA	ATGTGGA
	GCTCCAGA	ATGTGGAA
	AGCTCCAGA	ATGTGGAAT
10	CTCCAGG	AGGTGGA
	GCTCCAGG	AGGTGGA
	AGCTCCAGG	AGGTGGA
	GGTACGA	TCCTGGT
	GGGTACGA	TCCTGGTA
15	CGGGTACGA	TCCTGGTAG
	GGTGCGG	TCTTGGC
	GGGTGCGG	TCTTGGC
	CGGGTGCGG	TCTTGGC

20 Weitere bevorzugte DNA-Enzyme der vorliegenden Erfindung sind gegen Virus-RNA, insbesondere gegen einen Picornavirus, wie bspw. in Kayser et al., Medizinische Mikrobiologie, 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 1993, offenbart (z.B. Hepatitis-A-Virus, humane Enteroviren, wie Polio-, Coxsackie- und Echoviren, tierische Enteroviren, wie das für Schweine pathogene Tschen-Virus, humane Rhinoviren, wie Rhinovirus 14 usw. (ein Fachmann kennt über 80 Typen), tierische Rhinoviren, wie das Maul-und-Klauensäuge (MKS)-Virus, und Caliciviren, wie das Virus des vesikulären Exanthems der Schweine), gerichtet.

25

30 Die bevorzugte Ziel-RNA ist bspw. vom (vorzugsweise humanen) Rhinovirus 14 abgeleitet, wobei besonders vorteilhafte Ausführungsformen des DNA-Enzyms der vorliegenden Erfindung in den Abschnitten I und III zur 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) mindestens teilweise komplementär sind. Dieser Bereich umfasst

eine Konsensussequenz, die bei zahlreichen Picornaviren mit einer Gruppe I IRES konserviert ist. Spezifische Beispiele erfindungsgemäß, gegen den huma-  
nen Rhinovirus 14 und andere Picornaviren, insbesondere solche mit einer Grup-  
pe I IRES, gerichteter Sequenzen sind nachfolgend von 5' nach 3' angegeben,  
wobei gegebenenfalls auch eine in einem Nukleotid davon abweichende Sequenz  
möglich ist, mit der Maßgabe, daß sich das von den angegebenen Sequenzen  
abweichende Nukleotid nicht an einer der letzten drei Positionen des Abschnitts I  
und nicht an einer der ersten 3 Positionen des Abschnitts III befindet: (N = irgend-  
eine Base bzw. irgendein Nukleotid)

10	Abschnitt I	Abschnitt III
	GTGGGA	TTTAAGG
	GGTGGGA	TTTAAGGA
	GGGTGGGA	TTTAAGGAA

15 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bildet eine siRNA, die gegen VR1 gerichtet ist. Der Begriff „siRNA“ ist erfindungsgemäß ein doppelsträngiges RNA-Molekül (dsRNA), das 19 bis 29 Bp, insbesondere 21 bis 23 Bp, umfasst und eine der mRNA des VR1 komplementäre Sequenz aufweist. Die mRNA des VR1 ist vorzugsweise von Säugern, wie Mensch, Affe, Ratte, Hund,  
20 Katze, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Rind, Schwein, Schaf und Ziege, abgeleitet. Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen siRNA sind gegen Zielsequenzen der V1-mRNA gerichtet, die mit AA beginnen, einen GC-Gehalt von weniger als 50% aufweisen und/oder im Genom einzigartig sind und damit nur im Targetgen auftreten.

25 Eine besonders bevorzugte siRNA der vorliegenden Erfindung ist gegen eine Zielsequenz der VR1-mRNA gerichtet, welche die allgemeine Struktur 5'-AA (N<sub>19</sub>) TT-3' aufweist (wobei N für eine beliebige Base steht). Grundsätzlich kann die siRNA gegen jeden Abschnitt auf der VR1-mRNA gerichtet sein, insbesondere gegen codierende Abschnitte, ggf. aber auch nicht codierende Bereiche 30 (5'- oder 3'-terminal vom codierenden Bereich) oder im Überlappungsbereich zwischen codierendem und nicht codierendem Bereich. Allerdings kann eine erfin-

dungsgemäße siRNA auch gegen Zielsequenzen im Primärtranskript von VR1 gerichtet sein.

Insbesondere ist die erfindungsgemäße siRNA gegen Sequenzen gerichtet, die

5 aus der Gruppe, bestehend aus 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCAACTT-3', 5'-  
AAGUUCGUGACAAGCAUGUACTT-3', 5'-AAGCAUGUACAAACGAGAUCUUTT-3', 5'-  
AACCGUCAUGACAUGCUUCUCTT-3', 5'-AAGAAUAACUCUCUGCCUAUGTT-3' und 5'-  
AAUGUGGGUAUCAUCAACGAGTT-3', ausgewählt sind.

10 Besonders bevorzugte siRNA-Spezies der vorliegenden Erfindung sind folgende Duplexmoleküle:

Sense-Strang/Antisense-Strang

5'-GCGCAUCUUCUACUUCAACdTdT-3'/5'-GUUGAAGUAGAAGAUGC G C d T d T -3'

5'-GUUCGUGACAAGCAUGUACdTdT-3'/5'-GUACAUGCUUGUCACGA/CdTdT-3'

15 5'-GCAUGUACAACGAGAUCUUDdTdT-3'/5'-AAGAUCUCGUUGUACAU/CdTdT-3'

5'-CCGUCAUGACAUGCUUCUCdTdT-3'/5'-GAGAAGCAUGUCAUGACGGdTdT-3'

5'-GAAUAACUCUCUGCCUAUGdTdT-3'/5'-CAUAGGCAGAGAGUUUUCdTdT-3'

5'-UGUGGGUAUCAUCAACGAGdTdT-3'/5'-CUCGUUGAUGAUACCCACAddTdT-3'

20 Ganz besonders bevorzugt ist die vorstehende siRNA, deren Sense-Strang die Sequenz 5'-GCGCAUCUUCUACUUCAACdTdT-3' aufweist und deren Antisense-Strang die Sequenz 5'-GUUGAAGUAGAAGAUGC G C d T d T -3' aufweist.

siRNA-Moleküle können bei verschiedenen Anbietern, bspw. IBA GmbH (Göttingen, Deutschland), bezogen werden.

25 Die siRNA der vorliegenden Erfindung liegt gemäß bevorzugten Ausführungsformen chemisch modifiziert vor, insbesondere um einen vorzeitigen Abbau durch Nukleasen zu umgehen. Diesbezüglich gelten die vorstehenden Ausführungen im

30 Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen DNA-Enzymen entsprechend, insbesondere bspw. die Verwendung von Phosphorthioaten (wie bei Eckstein (Anti-

sense Nucleic Acid Drug Dev., 10 117, 2000) offenbart und vollinhaltlich Bestandteil der vorliegenden Offenbarung). Weiterhin kann bei der erfindungsgemäßen siRNA an der 2'-Position die Hydroxylgruppe modifiziert sein, um höhere Stabilität zu erlangen. Insoweit wird die Offenbarung bei Levin, Biochim. Biophys Acta, 5 1489, 69, 1999) vollinhaltlich in die vorliegende Offenbarung einbezogen.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Gegenstände, besonders die vorstehend definierte siRNA, die Expression des VR1 stärker unterdrücken als gewöhnliche Antisense-Oligonukleotide. 10 Insbesondere die erfindungsgemäße siRNA erweist sich vor allem *in vivo* als besonders wirksam und ist dabei bspw. (gewöhnlichen) unmodifizierten und modifizierten (Phosphorthioat, 2'-O-Methyl-RNA, LNA (LNA/DNA-Gapmeren)) Antisense-DNA-Oligonukleotiden überlegen.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Wirtszellen, ausgenommen humane Keimzellen und humane embryonale Stammzellen, die mit einem mindestens einem erfindungsgemäßen DNA-Enzym und/oder mindestens einer erfindungsgemäßen siRNA transformiert sind. Erfindungsgemäße DNA-Enzyme und siRNA-Moleküle können in die jeweilige Wirtszelle über übliche Methoden, bspw. Transformation, Transfektion, Transduktion, Elektroporation oder Partikel-Gun eingebracht werden. Als Wirtszellen kommen alle Zellen pro- oder eukaryontischer Natur in Betracht, bspw. von Bakterien, Pilzen, Hefen, pflanzlichen oder tierischen Zellen. Bevorzugte Wirtszellen sind Bakterienzellen, wie *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryontische Mikroorganismen, wie *Aspergillus* oder *Saccharomyces cerevisiae* oder die gewöhnliche Bäckerhefe (Stinchcomb et al. (1997) Nature 282: 39).

30 In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch zur Transformation mittels erfindungsgemäßer DNA-Enzyme oder siRNA-Konstrukte Zellen aus multizellulären Organismen gewählt. Im Prinzip ist jede höhere eukaryontische Zellkultur als Wirtszelle verfügbar, wenn auch Zellen von Säugern, bspw. Affen, Ratten, Hamstern, Mäusen oder Menschen, ganz besonders bevorzugt sind. Dem Fachmann

- ist eine Vielzahl von etablierten Zelllinien bekannt. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung werden die folgenden Zelllinien genannt: 293T (Embryonennierenzelllinie) (Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1997), BHK (Babyhamsterierenzellen), CHO (Zellen aus den Hamsterovarien, Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Accad. Sci. USA 77: 4216, (1980)), HeLa (humane Karzinomzellen) und weitere - insbesondere für den Laboreinsatz etablierte - Zelllinien, bspw. HEK293-, SF9- oder COS-Zellen. Ganz besonders bevorzugt sind humane Zellen, insbesondere neuronale Stammzellen und Zellen des "Schmerz-Weges", vorzugsweise primäre sensorische Neuronen. Humane Zellen, insbesondere autologe Zellen eines Patienten, eignen sich nach (vor allem *ex vivo*) Transformation mit erfindungsgemäßigen DNA-Enzymen oder siRNA-Molekülen, ganz besonders als Arzneimittel für bspw. gentherapeutische Zwecke, also nach Durchführung einer Zellentnahme, ggf. *ex vivo* Expansion, Transformation, Selektion und abschließender Retransplantation in den Patienten.
- Die Kombination aus einer Wirtszelle und einem zur Wirtszelle passenden erfindungsgemäßigen DNA-Enzym und/oder einer erfindungsgemäßigen siRNA bildet ein System, das zur Anwendung der erfindungsgemäßigen DNA-Enzyme bzw. siRNA-Moleküle dienen kann.
- Somit eignen sich die erfindungsgemäßigen Gegenstände als Arzneimittel, bspw. zur Inhibition der Nozizeption, bspw. aufgrund der Verminderung der Expression des VR1-Rezeptors mittels erfindungsgemäßer DNA-Enzyme und/oder siRNA.
- Folglich umfaßt die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der vorstehend genannten Gegenstände zur Behandlung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prävention von Schmerzen, insbesondere akuten oder chronischen Schmerzen, sowie auch die Verwendung zur Behandlung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Sensibilitätsstörungen, die mit dem VR1-Rezeptor zusammenhängen, bspw. zur Behandlung von Hyperalgesien, Neuralgien und Myalgien, sowie von allen mit VR1 zusammenhängenden

Erkrankungen und Erkrankungssymptomen, insbesondere Haminkontinenz, neurogenen Blasensymptomen, Pruritus, Tumoren und Entzündungen.

- Erfindungsgemäße Arzneimittel bzw. unter Verwendung der erfindungsgemäßen
- 5 Gegenstände hergestellte Arzneimittel enthalten neben den vorstehend definierten Gegenständen ggf. einen oder mehrere geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Erfindungsgemäße Arzneimittel können als flüssige Arzneiform in Form von Injektionslösung, Tropfen oder Säfte, als halbfeste Arzneiformen in Form von Granulaten, Tabletten, Pellets, Patches, Kapseln, Pflaster oder Aerosolen verab-
- 10 reicht werden und enthalten neben dem mindestens einen erfindungsgemäßen Gegenstand je nach galenischer Form ggf. Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Farbstoffe und/oder Bindemittel. Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängen davon ab, ob das Arzneimittel oral, peroral, parenteral, intravenös, intraperitoneal, intradermal, intra-
- 15 muskulär, intranasal, bukkal, rektal oder topisch, den Schleimhäuten, den Augen usw., appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen sich Zubereitungen in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen, für die parenterale, topische und inhalative Applikation Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstituierbare Trocken Zubereitungen sowie Sprays. Erfin-
- 20 dungsgemäße Gegenstände in einem Depot in gelöster Form oder in einem Pflaster, ggf. unter Zusatz von Fördernden Mitteln sind geeignete perkutane Applikationszubereitungen. Oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können die erfindungsgemäßen Gegenstände verzögert freisetzen. Die einem Patienten zu verabreichende Wirkstoffmenge variiert in Abhängigkeit
- 25 vom Gewicht des Patienten, von der Applikationsart, der Indikation und dem Grad der Erkrankung. Üblicherweise werden 2 bis 500 mg/kg Körpergewicht wenigstens eines erfindungsgemäßen Gegenstandes appliziert. Wenn das Arzneimittel insbesondere zur Gentherapie verwendet werden soll, empfehlen sich als geeignete Hilfs- oder Zusatzstoffe bspw. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Protease- oder DNase-Inhibitoren usw.
- 30

Geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe sind als bspw. Lipide, kationische Lipide, Polymere, Liposomen, Nukleinsäure-Aptamere, Peptide und Proteine (z.B. tet-, Transportin, Transferrin, Albumin oder Ferritin), vorzugsweise solche, die an DNA oder RNA gebunden sind (oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle), um bspw. die

- 5 Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle zu erhöhen, um das Arzneimittelgemisch auf nur eine Untergruppe von Zellen zu richten, um den Abbau der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in der Zelle zu verhindern, um die Lagerung des Arzneimittelgemischs vor der Verwendung zu erleichtern usw. Beispiele für Peptide und Proteine oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Liganden, Adhäsionsmoleküle, die alle modifiziert oder unmodifiziert sein können. Hilfsstoffe, die bspw. die DNA-Enzyme und/oder siRNA in der Zelle stabilisieren, sind z.B. Nukleinsäure-kondensierende Substanzen wie kationische Polymere, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin.
- 10
- 15 Bei einer lokalen Anwendung erfindungsgemäßer Gegenstände, bspw. von erfindungsgemäßen DNA-Enzymen oder siRNA-Konstrukten, erfolgt die Verabreichung durch Injektion, Katheter, Suppositorium ("Zäpfchen"), Aerosole (Nasen- bzw. Mundspray, Inhalation), Trokars, Projektilen, pluronische Gele, Polymere, die anhaltend Medikamente freisetzen, oder irgendeine andere Vorrichtung, die einen lokalen Zugang ermöglicht. Auch die ex vivo Anwendung des erfindungsgemäßen Arzneimittelgemischs, das zur Behandlung der vorstehend genannten Indikationen verwendet wird, erlaubt einen lokalen Zugang.
- 20

- Erfindungsgemäße Gegenstände können ggf. in einer Zusammensetzung als Arzneimittel- (Wirkstoff)gemisch mit bspw. mindestens einem weiteren Schmerzmittel oder antiviralem und/oder anderem zur Behandlung von mit (rhino-)viralen Infektionen in Zusammenhang stehenden Erkrankungen geeigneten Mittel kombiniert werden.
- 25
  - 30 Auf diese Weise können erfindungsgemäße Gegenstände bspw. in Verbindung mit Opiaten und/oder synthetischen Opoiden (bspw. Morphin, Levomethadon, Codein, Tramadol, Buprenorphin) und/oder NSAID (bspw. Diclofenac, Ibuprofen,

- Paracetamol) kombiniert werden, bspw. in einer der vorgenannt offenbarten Verabreichungsformen oder auch im Zuge einer kombinierten Therapie in jeweils separierten Verabreichungsformen mit ggf. unterschiedlicher Konfektionierung in einem an die Bedürfnisse des jeweiligen Patienten angepassten medizinisch sinnvoll gestalteten Therapieplan. Bevorzugt ist die Verwendung derartiger Zusammensetzungen als Arzneimittelgemische mit bspw. etablierten Analgetika zur Behandlung (bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung) von vorliegend offenbarten medizinischen Indikationen.
- 10 Die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme und siRNA-Moleküle können nach einem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden. Die entsprechenden Nukleotid werden bspw. nach Art der Merrifield-Synthese an einem unlöslichen Träger (H.G. Gassen et al. (1982) *Chemical and Enzymatic Synthesis of Genefragments*, Verlag Chemie, Weinheim) oder auf andere Art synthetisiert (Beyer und Walter (1984) *Lehrbuch der organischen Chemie*, Seite 816 ff., 20. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart). Ebenfalls können die erfindungsgemäßen Gegenstände auch nach bekannten Verfahren *in situ* auf Glas, Kunststoff, oder Metall, z.B. Gold, synthetisiert werden. □
- 20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inhibition der Expression eines Gens, umfassend das Einbringen einer der erfindungsgemäßen Gegenstände, insbesondere des vorstehend definierten DNA-Enzyms und/oder der siRNA in eine das jeweilige Gen exprimierende Zelle. Ein bevorzugtes Zielgen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das VR1-Gen, wobei entsprechend ein gegen die mRNA des VR1 gerichtetes DNA-Enzym und/oder eine entsprechende siRNA in die Zelle eingebracht werden bzw. wird.

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Gegenstände in die Zelle kann dabei auf die vorstehend dargelegte Art und Weise erfolgen.

30

Die Figuren zeigen:

- Fig. 1 ist die schematische Darstellung eines DNA-Enzyms des Typs 10-23 gemäß Santoro et al. (1997), *supra*, (Fig. 2, S. 4264) (einschließlich RNA-Substrat). Der obere, mit einem Pfeil gekennzeichnete Strang ist der zu spaltende RNA-Strang, wobei der Pfeil die Spaltstelle angibt. Der untere Strang ist eine Darstellung des DNA-Enzyms. In Bezug auf bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen DNA-Enzyms ist dabei im oberen Strang das Y = U und das R = G. Die Spaltstelle auf dem oberen Strang ist daher eine sog. GU-Spaltstelle, die von DNA-Enzymen besonders effektiv gespalten wird. Entsprechend ist R im unteren Strang = A. Dem schließen sich 5'-wärts bspw. die weiteren Nukleotide aus den vorstehend definierten Abschnitten I an. Im Abschnitt III schließen sich dann direkt an das am Abschnitt III anliegend ungepaarte A aus 5'-Richtung 3'-wärts die Nukleotide des zweiten zum RNA-Substrat komplementären Teils des DNA-Enzyms, bspw. die vorstehend genannten Sequenzen, an. Die Abschnitte I und Abschnitte III binden also das Substrat und werden daher als Substraterkennungsarme des DNA-Enzyms bezeichnet.
- Fig. 2 zeigt die Strukturen von Phosphorthioat-Nukleotiden, invertiertem Thymidin, 2'-O-Methyl-Ribonukleotiden und LNA-Ribonukleotiden.
- Fig. 3 zeigt in einer der Fig. 1 entsprechenden Darstellung die allgemeine Struktur eines DNA-Enzyms vom Typ 10-23 mit der erfindungsgemäßen Konsensussequenz des Abschnitts II (katalytische Kernsequenz). Nicht-essentielle Nukleotide, die durch jedes andere Nukleotid ohne wesentlichen Aktivitätsverlust ausgetauscht werden können, sind mit N bezeichnet, N' steht für jedes zu N komplementäre Nukleotid. R bezeichnet ein Nukleotid, das bevorzugt eine Purin-Base enthält. Y steht für ein Nukleotid, das bevorzugt eine Pyrimidin-Base enthält. R' steht für ein zu Y komplementäres Nukleotid, das ein Purin enthält. M steht für A oder C, H steht für A, C oder T, und D steht

für G, A oder T. Der Bereich, der wahrscheinlich direkt an der Bildung der katalytischen Zentrums beteiligt ist, ist mit einer gepunkteten Linie markiert. Exocyclische funktionelle Gruppen, die zur Aktivität des DNA-Enzyms erforderlich sind, sind jeweils angegeben.

5

Fig. 4 zeigt in einer graphischen Darstellung die relativen Aktivitäten modifizierter DNA-Enzyme gegen die 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14 (DH 5) jeweils unter 10fachem Überschuß an DNA-Enzymen ("Single Turnover"-Bedingungen, STO, jeweils linker Balken) und 10fachem Substratüberschuß ("Multiple Turnover"-Bedingungen, MTO, jeweils rechter Balken). Die Aktivitäten sind auf das unmodifizierte DNA-Enzym mit 9 Nukleotiden langen Substraterkennungsarmen normiert. Die angegebenen DNA-Enzyme wiesen die folgenden Modifikationen auf: Phosphorthioat (Thio), invertiertes Thymidin (iT), 2'-O-Methyl-RNA (OMe) und LNA (LH). Die erste Zahl bedeutet dabei die Länge der Substraterkennungsarme, während die zweite Zahl die Anzahl der modifizierten Nukleotide am Ende der Arme angibt. CM6 ist ein erfindungsgemäßes DNA-Enzym, bei dem die Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 der Kernsequenz modifiziert sind (2'-O-Methyl-Ribonukleotide). CM12 ist ein Vergleichskonstrukt, bei dem 12 Nukleotide der Kernsequenz (alle außer Positionen 3, 5 und 10) modifiziert sind. DH5-9 bezeichnet das unmodifizierte DNA-Enzym gegen die 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14 mit 9 Nukleotiden langen Substraterkennungsarmen, während DH5-7 das entsprechende DNA-Enzym mit 7 Nukleotiden langen Substraterkennungsarmen kennzeichnet. Durch optimales Design der Substraterkennungsarme (siehe OMe7-4 und OMe7-5) kann die Aktivität des DNA-Enzyms unter MTO-Bedingungen, die z.B. für den Einsatz *in vivo* entscheidend sind, um mehr als den Faktor 20 erhöht werden. Das Enzym, bei dem die genannten 6 Nukleotide in der Kernsequenz zusammen gegen die entsprechenden 2'-O-Methyl-Ribonukleotide ausgetauscht sind, ist noch immer im wesentlichen

10

15

20

25

30

so aktiv wie das unmodifizierte DNA-Enzym (vgl. CM6 und DH 5-9). Das DNA-Enzym, bei dem 12 Nukleotide der Kettsequenz modifiziert sind, spaltet unter STO-Bedingungen die vollständige 5'-UTR mit guter Effektivität, ist jedoch unter MTO-Bedingungen gegenüber dem vollständigen (langen) Target inaktiv (vgl. CM12). Werden die in CM12 gemeinsam ausgetauschten Nukleotide jeweils einzeln modifiziert, spalten die entsprechenden Konstrukte einen 19-meren kurzen Abschnitt aus der Ziel-RNA (5'-UTR des humanen Rhinovirus 14), der zu den Substraterkennungsarmen komplementär ist (nicht gezeigt). Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente.

Fig. 5 zeigt in einem Diagramm die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Substratspaltung ( $v_{init}$ ) vom Schmelzpunkt der bei einem DNA-Enzym gebildeten Helices zwischen den Abschnitten I bzw. III (Substraterkennungsarme) mit der Targetsequenz im Fall der gemäß Fig. 4 untersuchten DNA-Enzyme. Danach ist ein Optimum der Anfangsgeschwindigkeit vom Schmelzpunkt, das etwas oberhalb der Reaktionstemperatur (37°C) liegt, festzustellen. Im vorliegenden Fall ergibt sich eine optimale Schmelztemperatur von 39°C.

Fig. 6 zeigt in Figur 6A die Ergebnisse eines Experiments auf der Basis einer hundertfachen Überschusses der kurzen 19 Nukleotide langen Ziel-RNA (target RNA). Hierzu wurde dieser Überschuß mit DNAzymen bei 37°C für 20 min inkubiert. Das ungespaltene Substrat (obere Bande) und das 5'-Spaltprodukt (untere Bande) sind zu sehen. Folgende Auftragungen sind in den einzelnen Spuren zu sehen: Spur 1: Kontrolle ohne Enzym, Spur 2: nicht modifiziertes DH5, Spuren 3 bis 17 (bezeichnet als 1 bis 15 in der Auftragung): DNAzyme mit 2'-O-Methyl-RNA jeweils an einer der Positionen 1 bis 15 (in entsprechender numerischer Reihenfolge).

Figur 6B zeigt in einer graphischen Darstellung die relativen Spaltungsaktivitäten von DNA-Enzymen gegen die 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14, bei denen jeweils ein Nukleotid der Kernsequenz (Positionen 1 bis 15 entsprechend den Proben M1 bis M15) einzeln durch 2'-O-Methyl-Modifikationen modifiziert wurden. Die jeweilige Aktivität ist auf das entsprechende unmodifizierte DNA-Enzym mit 9 Nukleotiden langen Erkennungsarmen normiert. Danach können die Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 ohne Aktivitätsverlust bzw. mit Aktivitätsgewinn modifiziert werden. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente mit der angegebenen Standardabweichung, und zwar für die kurzen Zielmoleküle (graue Balken) und die langen Zielmoleküle (schwarze Balken). Die Balkenhöhe gibt den Prozentsatz der Spaltung von Ziel-RNA durch DNAzyme (DNA-Enzyme) an.

15

Fig. 7 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A) und korrespondierende Western-Blot-Analysen (B) von Zellen, die zum Vergleich der Aktivitäten von Konstrukten bezüglich der Hemmung der Expression von VR1 mit einem für VR1-GFP codierenden Plasmid und verschiedenen Antisense- und siRNA-Konstrukten cotransformiert wurden. 2'-O-Methyl-RNA, LNA-Gapmer, Phosphorthioat-RNA oder siRNA wurde in Konzentrationen zwischen 10 und 50 nM verwendet. Invertierte Oligonukleotide für jede Modifikation und der Sense-Strang der siRNA dienten als Kontrollen und wurden in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Wie die fluoreszenzmikroskopische Analyse in (A) zeigt, unterdrückt die erfindungsgemäße siRNA die VR1-GFP-Expression bereits bei einer Konzentration von nur 10 nM vollständig, während das LNA-Gapmer erst bei einer Konzentration von 25 nM zu einer im wesentlichen vollständigen Suppression der Expression von VR1-GFP führt. Eine teilweise Hemmung der VR1-GFP-Expression wird beim Phosphorthioat-Antisense-ODN bei höherer Konzentration beobachtet, während das 2'-O-Methyl-modifizierte

20

25

30

5

ODN im beobachteten Konzentrationsbereich keine Verminderung der Expression des VR1-GFP-Konstrukts bewirkte. Die Western-Blot Analyse (B) bestätigt die fluoreszenzmikroskopischen Experimente (V: Bande des VR1-GFP-Konstrukts; A: Bande von Aktin (Kontrolle)).

10

15

Fig. 8 zeigt eine Western-Blot-Analyse von Zellen, die wie bei Fig. 7 beschrieben, hier jedoch bei für jedes Konstrukt optimalen Konzentrationen, cotransformiert wurden, um die Effizienz der Inhibition der VR1-GFP-Expression von erfindungsgemäßer siRNA mit Antisense-ODN eingehender zu vergleichen. Die Aktin-Bande diente als Kontrolle.

20

25

Fig. 9 zeigt eine graphische Darstellung der quantitativen Auswertung von der Fig. 8 entsprechenden Western-Blot-Analysen. Die Proteingehalte in den einzelnen Spuren wurden mit dem Programm Quantity One bestimmt. Gezeigt sind jeweils die einer sigmoiden Kurve angepassten Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Durch diese quantitative Auswertung konnten den jeweiligen Inhibitoren Schätzwerte der für eine 50%ige Suppression der VR1-GFP-Expression erforderlichen Konzentration ( $IC_{50}$ -Wert) zugeordnet werden (vgl. auch die nachstehende Tab. 3).

30

35

Fig. 10 zeigt graphische Darstellungen der Ergebnisse von Experimenten zur analgetischen *in vivo* Wirksamkeit erfindungsgemäßer siRNA (A) im Vergleich zu Kontroll-RNA (B), wobei jeweils mit reiner NaCl-Lösung behandelte Tiere als Kontrollen dienten. Es wurde das Schmerzmodell der Ratte nach Bennett verwendet. Aufgetragen sind jeweils die innerhalb von 2 min gezählten Wegziehreaktionen der verletzten Pfote in Abhängigkeit von der Dauer nach der Operation (Operationstag = Tag 1). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Gruppen mit 9 oder 10 Tieren gezeigt. Die

Applikation erfindungsgemäßer siRNA bewirkte an den Tagen 2, 3 und 4 eine Verminderung der Wegziehreaktionen von etwa 30 auf 13, 10 bzw. 20 (A), während die Kontroll-RNA (Sense-Strang der siRNA) keine signifikante analgetische Wirkung zeigte (B).

5

Fig. 11 In Figur 11 ist die Stabilität von modifizierten DNA-Enzymen im Zellkulturmedium dargestellt. Hierzu wurden die DNA-Enzyme bei einer Endkonzentration von  $1\mu\text{M}$  in DMEM mit 10%igem fötalen Rinderse-  
rum inkubiert. Aliquots wurden zu bestimmten Zeiten entnommen und die verbleibende Menge von Volllängenoligonukleotiden wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Durchschnittliche Halbwertszeiten und Halbwertszeiten („half life“), normalisiert ge-  
genüber nicht-modifiziertem DNAzym aus drei Experimenten werden angegeben. Die Bedeutungen der Abkürzungen sind in der Tabelle 4  
angegeben.  
Modifikationen der Bindungsarme mit LNA-Nukleotiden und Phosphorthionaten erhöhte die Halbwertszeit von 2h auf ca. mehr als 20 h. Ein invertiertes Thymidin am 3'-Ende erhöhte die Stabilität um den Faktor 10. 2'-O-Methylmodifikationen, die ausschließlich an den Bindungsarmen angeordnet sind, erwiesen sich als anderen Modifi-  
kationen deutlich unterlegen (Halbwertszeiten von ca. 6,5 h). Das neu entworfene DNAzym DH5 E (mit 2'-O-Methylnukleotiden an bei-  
den Bindungsarmen und dem katalytischen Zentrum) erwies sich als gegenüber Degradation ausgesprochen resistent. Die Halbwertszeit wurde auf 25 h erhöht.

10

15

20

25

30

Fig. 12 Figur 12 stellt einen Vergleich der Stabilität von DNAzymen gegen-  
über der S1-Endonuklease dar. DNAzyme wurden bei einer Kon-  
zentration von  $2\mu\text{M}$  mit 0,4 U S1 Endonuklease inkubiert pro 100  
pmol DNAzym inkubiert. Aliquots wurden zu entsprechenden zeit-  
punkten abgenommen. Volllängen- und abgebaute Oligonukleotide

wurden auf einem 20%igen denaturierendem Polyacrylamidgel separiert. Halbwertszeiten und relative Stabilität, normalisiert gegenüber nicht-modifiziertem DNAzym sind angegeben.

- 5                   Wie aus Figur 12 erkannt werden kann, wird unmodifiziertes DNAzym und DNAzyme mit invertiertem Thymidin und 2'-O-Methyl RNA "end-blocks" fast vollständig nach 30 Minuten mit einer Halbwertszeit von ca. 8 Minuten abgebaut. Die Oligonukleotide, die LNA-Monomere enthalten, werden nur schwach durch Ethidiumbromid angefärbt. Es kann erkannt werden, daß das DNAzym, das durch die Einführung von LNAs in den Substraterkennungsarmen stabilisiert wurde, stabiler gegenüber S1-Endonuklease als das unmodifizierte DNAzym war. DH5-Thio zeigte eine zweiphasige Degradationskurve, was auf die chirale Natur der modifizierten Nukleotide zurückzuführen ist. Ungefähr 50% der Startmenge wird durch die Endonuklease mit einer Halbwertszeit von ca. 13 Minuten abgebaut. Die andere Hälfte unterliegt einer viel langsameren Degradationskonstante. Das optimierte DNAzym mit 2'-O-Methyl-Monomeren im katalytischen Kern und in den Substraterkennungsarmen hat die längste Halbwertszeit aller untersuchten modifizierten Enzyme. Seine Stabilität wird mehr als zweifach gegenüber dem unmodifizierten DNAzym erhöht.
- 10
- 15
- 20
- 25                  Fig. 13         In Figur 13 werden die erfindungsgemäß Modifikationen von optimierten DNAzymen dargestellt. Hierbei zeigt die linke Darstellung in Figur 13 DNAzyme gegen das 5'-NTR (nicht-translatierte Region) von HRV14 (DH5) und gegen VR1 mRNA (DV15) auf der rechten Seite und ihre jeweiligen Substrate RNAs. Die Position der ZielRNAs, die durch die DNAzyme gebunden sind, werden indiziert und die Nukleotide, an welchen 2'-O-Methyl-RNA-Monomere in die DNAzyme eingeführt wurden, sind markiert.
- 30

Die folgenden Ausführungsbeispiele erläutern die vorliegende Erfindung näher, ohne sie einzuschränken.

5

**Beispiel 1****DNA-Enzyme**

10 Es wurden DNA-Enzyme mit den folgenden Sequenzen untersucht:

1. DNA-Enzyme gegen VR1

DV15-9: ATGTCGTGGGGCTAGCTACAAACGAGATTAGG  
15 DV15-7: GTCGTGGGGCTAGCTACAAACGAGATTAGG  
(Substraterkennungsarme unterstrichen)

DV15-Konstrukte sind gegen das 15. GUC der mRNA des humanen VR1 gerichtet.

20

2. DNA-Enzyme gegen humanen Rhinovirus 14

DH5-9: CCGGGGAAAGGCTAGCTACAAACGAAGAAGTGCT

5 DH5-8: CGGGGAAAGGCTAGCTACAAACGAAGAAGTGC

DH5-7: GGGGAAAGGCTAGCTACAAACGAAGAAGTG

(Substraterkennungsreime unterstrichen)

DH5-Konstrukte sind gegen die 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14, gerichtet,  
10 eine Konsensussequenz, die zwischen zahlreichen Picornaviren mit einer Gruppe  
I IHRES homolog ist.

*Substrate*

15 1. VR1 mRNA

VR1 mRNA wurde durch *in vitro* Transkription hergestellt. Zunächst wurde die  
cDNA des VR1 in den Vektor pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) kloniert. Anschließend  
erfolgte die *in vitro* Transkription mit dem RiboMAX Large Scale RNA Production  
20 System - T7 (Promega) nach den Angaben des Herstellers.

2. 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14

Die der 5'-UTR des humanen Rhinovirus 14 entsprechende DNA wurde im Vektor  
25 pCR2.1 (Stratagene) von Prof. Zeichhardt (Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin) erhalten. Nach Linearisierung mit *Bam*H I wurde zur  
Gewinnung der Ziel-RNA eine *in vitro* Transkription wie bei der VR1 mRNA  
durchgeführt.

*Messung von DNA-Enzymaktivitäten*

Enzymaktivitäten wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei 37°C

5 gemessen. Bei „Single Turnover“ (STO)-Kinetiken wurden die DNA-Enzyme im 10-fachen Überschuß (100 nM RNA-Substrat; 1 μM DNA-Enzym) zum Substrat verwendet. Für „Multiple Turnover“ (MTO)-Experimente wurde das RNA-Substrat im 10-fachen Überschuß (100 nM RNA-Substrat; 10 nM DNA-Enzym) eingesetzt. Es wurden jeweils Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

10

*Einfluß von Modifikationen in den Substraterkennungsarmen auf die Aktivität von DNA-Enzymen*

Es wurden die Aktivitäten der unmodifizierten DNA-Enzyme DH-5 und DV-15 mit

15 9 Nukleotiden (DH5-9, DV15-9) bzw. 7 Nukleotiden (DH5-7) aufweisenden Substraterkennungsarmen mit folgenden in den Substraterkennungsarmen chemisch modifizierten DNA-Enzymen gleicher Basensequenz unter STO- und MTO-Bedingungen verglichen (Bei den 2'-O-Methyl-Ribose- und LNA-modifizierten Spezies befanden sich die modifizierten Nukleotide jeweils am 5'-Ende des ersten  
20 Substraterkennungsarms (Abschnitt I) und am 3'-Ende des zweiten Substraterkennungsarms (Abschnitt III).):

**Tab 1.: DNA-Enzyme mit spezifischen Nukleotid-Modifikationen in den Substraterkennungsarmen**

Bezeichnung	Länge der Arme	Modifikation
OMe9-4	9	2'-O-Methyl-Ribose, 4 Nukleotide
OMe8-4	8	2'-O-Methyl-Ribose, 4 Nukleotide
OMe7-3	7	2'-O-Methyl-Ribose, 3 Nukleotide
OMe7-4	7	2'-O-Methyl-Ribose, 4 Nukleotide
OMe7-5	7	2'-O-Methyl-Ribose, 5 Nukleotide
OMe7-6	7	2'-O-Methyl-Ribose, 6 Nukleotide
OMe7-7	7	2'-O-Methyl-Ribose, 7 Nukleotide
OMe6-5	6	2'-O-Methyl-Ribose, 5 Nukleotide
DH5-iT	9	invertiertes Thymidin, 1 Nukleotid
DH5-Thio	9	Phosphorthioat, 9 Nukleotide
LH5-9/4	9	LNA-Ribose, 4 Nukleotide
LH5-7/3	7	LNA-Ribose, 4 Nukleotide
LH5-7/4	7	LNA-Ribose, 4 Nukleotide

5

Die Ergebnisse der Vergleichsexperimente mit den gegen humanen Rhinovirus 14 (d.h. DH5-Konstrukte) sind in der Fig. 4 dargestellt, wobei die Aktivität des unmodifizierten DNA-Enzyms mit 9 Nukleotiden langen Substraterkennungsarmen (DH5-9) gleich 1 gesetzt wurde. Die insbesondere für *in vivo* Anwendungen entscheidenden Aktivitäten unter MTO-Bedingungen zeigen, dass in den Substraterkennungsarmen modifizierte DNA-Enzyme keine wesentlichen Aktivitätseinbußen gegenüber den unmodifizierten Vergleichskonstrukten (DH5-9 und DH5-7) aufweisen. Darüber hinaus ist festzustellen, dass 2'-O-Methyl-Ribose- und LNA-modifizierte Konstrukte, insbesondere solche, bei denen nicht alle Nukleotide modifiziert sind bzw. eine Anpassung der Länge der Substraterkennungsarme vorgenommen wird, eine gegenüber dem nicht modifizierten Vergleichskonstrukt zum Teil vervielfachte Aktivität zeigen. Bei 2'-O-Methyl-Ribose-modifzierten (3, 4 bzw.

5 modifizierte Nukleotide, Substraterkennungsarme mit 7 oder 8 Nukleotiden) ergeben sich Aktivitäten unter MTO-Bedingungen, die über 10fach bis über 20fach größer als diejenigen der unmodifizierten DNA-Enzyme sind.

- 5 Bei dem DNA-Enzym gegen VR1 (DV15) ergab sich für das Konstrukt mit 5 2'-O-Methyl-Ribonukleotiden an den Enden von 7 Nukleotide langen Substraterkennungsarmen im Vergleich zum unmodifizierten Konstrukt folgender Wert der Anfangsgeschwindigkeit unter MTO-Bedingungen:

10	DV15 (unmod.):	$0,5 \pm 0,1 \text{ nM/min}$
	DV15-7/5:	$1,7 \pm 0,2 \text{ nM/min}$

Somit ist das modifizierte Konstrukt gegen den VR1 mehr als dreimal so aktiv wie das korrespondierende unmodifizierte DNA-Enzym.

15 **Beispiel 2**

*Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Schmelzpunkt zwischen DNA-Enzym und Substrat*

- 20 Die erfindungsgemäßen Modifikationen 2'-O-Methyl- und LNA-Ribonukleotide erhöhen die Affinität zum Substrat (d.h. der Schmelzpunkt der zwischen dem Abschnitt I bzw. III mit der Targetsequenz gebildeten Helices erhöht sich). Für eine optimale Aktivität unter MTO-Bindungen ist jedoch auch eine effiziente Produktfreisetzung erforderlich, weshalb die Affinität zum Substrat nicht zu hoch sein sollte. Wird daher bei den erfindungsgemäß modifizierten DNA-Enzymen gemäß vorstehender Tab. 1 die Anfangsgeschwindigkeit unter MTO-Bedingungen ( $v_{\text{Init}}$ ) in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur mit dem Substrat aufgetragen, so wird eine Korrelation zwischen der Schmelztemperatur und der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, die in erster Näherung einer Gauss-Verteilung um ein Optimum bei etwa 39°C angeglichen werden kann (Fig. 5).
- 30

**Beispiel 3***Einfluß von Modifikationen in der Kernsequenz auf die Aktivität von DNA-Enzymen*

5

Die 15 Nukleotide der Kernsequenz von DH5 wurden einzeln durch entsprechende 2'-O-Methyl-Ribonukleotide ersetzt und die Reaktionsgeschwindigkeit unter MTO-Bedingungen, wie im Beispiel 1 angegeben, gemessen. Dabei wurde festgestellt, daß die Nukleotide 2, 7, 8, 9, 11, 14 und 15 ohne Aktivitätsverlust gegen 10 modifizierte Nukleotide ausgetauscht werden konnten (Fig. 6). Es ergab sich sogar ein Aktivitätsgewinn von mindestens 20%.

Weiterhin wurden die 6 Nukleotide bei DH5 zusammen gegen die 2'-O-Methyl-Ribose-modifizierten Nukleotide ausgetauscht (Konstrukt CM6). Dabei blieb die 15 Aktivität gegenüber dem unmodifizierten Konstrukt im wesentlichen erhalten (Fig. 4; vgl. CM6 mit DH5-9).

Beim DNA-Enzym gegen den VR1 konnten die obigen Nukleotide der Kernsequenz zusammen modifiziert werden, wobei die Aktivität gegenüber dem unmodifizierten Konstrukt nicht nur erhalten blieb, sondern sogar eine gesteigerte Aktivität beobachtet wurde:

$$\begin{array}{ll} \text{DV15 (unmod.)}: & 0,5 \pm 0,1 \text{ nM/min} \\ \text{DV15-CM6}: & 0,8 \pm 0,2 \text{ nM/min} \end{array}$$

25 **Beispiel 4***Einfluß der Kombination von Kernsequenz- und Substraterkennungsarm-Modifikationen auf die Aktivität von DNA-Enzymen*

30 Des weiteren wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit unter MTO-Bedingungen beim DNA-Enzym gegen humanen Rhinovirus 14 mit 7 Nukleotide

langen Substraterkennungsarmen untersucht, bei dem die Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 der Kernsequenz sowie jeweils vom Ende der Substraterkennungsarme 5 Nukleotide gegen entsprechende 2'-O-Methyl-Ribonukleotide ausgetauscht wurden.

5

Dabei ergab sich eine fast 10fach erhöhte Aktivität des modifizierten, d.h. vollständig stabilisierten, gegenüber dem unmodifizierten Konstrukt:

DH5-9 (unmod.):  $0,21 \pm 0,03$  nM/min

DH5-9 (vollst. stab.):  $2,0 \pm 0,1$  nM/min

10

### Beispiel 5

*Vergleich der Effizienz der Inhibition der VR1-Expression durch siRNA mit verschiedenen Antisense-Oligonukleotid-Konstrukten*

15

#### siRNA und Antisense-Oligonukleotide

VR1-spezifische siRNA wurde bei IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) oder

MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) als entschütztes und entsalztes

20 Duplexmolekül hergestellt. Erfindungsgemäße siRNA ist gegen die Zielsequenz des Typs AA (N<sub>19</sub>) TT gerichtet. Die Sequenzen der Beispielkonstrukte sind in der Tab. 2 gezeigt.

**Tab. 2:** Sequenzen von siRNA-Beispielkonstrukten

Konstrukt	Sense-Strang (Sinn-Strang)	Antisense-Strang (Gegensinn-Strang)
VsiRNA1	5'-GCGCAUCUUCUACUUCAACdTdT-3'	5'-GUUGAAGUAGAAGAUGC G C d T d T -3'
VsiRNA2	5'-GUUCGUGACAAGCAUGUACdTdT-3'	5'-GUACAUGCUUGUCACGAACdTdT-3'
VsiRNA3	5'-GCAUGUACAAACGAGAUCUUDdTdT-3'	5'-AAGAUCUCGUUGUACAUGC d T d T -3'
VsiRNA4	5'-CCGUCAUGACAUGCUUCUCdTdT-3'	5'-GAGAAGCAUGUCAUGACGGdTdT-3'
VsiRNA5	5'-GAAUAACUCUCUGCCUAUGdTdT-3'	5'-CAUAGGCAGAGAGUUAUUCdTdT-3'
VsiRNA6	5'-UGUGGGUAUCAUCAACGAGdTdT-3'	5'-CUCGUUGAUGAUACCCACAddTdT-3'

5

Unmodifizierte und modifizierte ODN und Phosphorthioate wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. 2'-O-Methyl-RNA wurde von IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) erhalten. LNA (LNA/DNA-Gapmere) wurden von Proligo (Boulder, CO, USA) bezogen. Die Sequenzen der Antisense-Oligonukleotide waren:

V15: 5'-CATGTCATGACGGTTAGG-3'

V30: 5'-ATCTTGTGACGGTCTCA-3'

15 Als Kontrollen wurden die folgenden invertierten Sequenzen verwendet:

V15inv: 5'-GGATTGGCAGTACTGTAC-3'

V30inv: 5'-ACTCTGGCAGTTGTTCTA-3'

20 Bezuglich der siRNA diente deren Sense-Strang als Negativkontrolle.

Der Sequenz von V30 entsprechende LNA/DNA-Gapmere enthielten acht oder zehn unmodifizierte DNA-Monomere im Zentrum und fünf oder vier LNA-Monomere an jedem Ende. Das 2'-O-Methyl-modifizierte V30-Oligonukleotid wur-

de ebenfalls als Gapmer mit fünf 2'-O-Methyl-Ribonukleotiden an jedem Ende und acht Oligodesoxynukleotiden im Zentrum synthetisiert.

Zellkultur und Transfektion

5 COS-7-Zellen (Nierenfibroblasten des Afrikanischen Grünaffen) wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> in DMEM (PAA laboratories, Deutschland), enthaltend 10% FCS (PAA laboratories, Deutschland), Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (beide Antibiotika von Invitrogen, Deutschland), kultiviert. Die Zellen wurden durch Verdünnen (1:10) vor dem Erreichen der Konfluenz passagiert, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium ohne Antibiotika resuspendiert und in Platten mit 24 Vertiefungen in einer Dichte von 8 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung in einem Volumen von 500 µl überführt. Transfektionen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Deutschland) durchgeführt. Es wurde ein pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO Plasmid (Invitrogen, Deutschland), das für das VR1-GFP-Fusionsprotein codiert, verwendet. Für jede Transfektion wurden 1 µg Plasmid-DNA und die jeweilige Menge an Antisense-Oligonukleotid bzw. siRNA mit 50 µl OPTIMEM (Invitrogen, Deutschland) vermischt. In einem getrennten Ansatz wurden für jede Reaktion 2,5 µl Lipofectamine 2000 zu 50 µl OPTIMEM gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Lösungen wurden vermischt und zur Komplex-Bildung für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden dann zu den Zellen in der Platte mit 24 Vertiefungen gegeben, wobei das Endvolumen 600 µl betrug. Die Zellen wurden bei 37°C 10 in Gegenwart der Transfektionslösung für mindestens 24 h inkubiert.

15

20

25

Fluoreszenzmikroskopie und Immunblot

Die Transfektionseffizienz und die Inhibition der Expression des VR1-GFP-Fusionsproteins wurden durch Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot analysiert. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, 200 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) wurden zugefügt, und es wurden Fluoreszenzbilder unmittelbar

30

von den lebenden Zellen unter Verwendung eines Leica DM IRB Fluoreszenzmikroskops aufgenommen.

Für Western-Blot-Experimente wurden die Zellen unmittelbar in Platten mit 24 Vertiefungen mit Lysispuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 1,4 M β-Mercaptoethanol, 25% Glycerin und 0,05% Bromphenolblau) lysiert. Das gesamte Lysat wurde für 5 min bei 95°C gekocht, und es wurden jeweils gleiche Proteinmengen in 10% Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (Amersham, Deutschland) wurde mit einem Blot-Gerät im Halbtrocken-Verfahren (BioRad, Deutschland) durchgeführt. Für Immunreaktionen wurden die Membranen mit einem GFP-Antiserum (Invitrogen, Deutschland) (Verdünnung 1:5000) inkubiert. Sekundärantikörper waren mit Alkalischer Phosphatase (AP) (Chemicon, Deutschland) gekoppelt und wurden 1:5000 verdünnt. Als Chemilumineszenzsubstrat wurde CDP-Star (Roche, Deutschland) verwendet. Um zu überprüfen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Membranen einer weiteren Immunreaktion mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Aktin (Chemicon, Deutschland) unterworfen.

#### Quantifizierung von Antisense-Effekten auf Proteinmengen

Proteinmengen auf Western-Blots wurden mit Hilfe der Quantity One Software (BioRad, Deutschland) quantifiziert. Die Antisense-Effekte wurden durch teilen der Menge des VR1-Proteins in Gegenwart der Antisense-Oligonukleotide oder siRNA bzw. der Kontroll-Oligonukleotide berechnet. Sämtliche Werte wurden auf die Menge von Aktin als internem Standard normiert. Die Werte wurden näherungsweise an eine sigmoidale Boltzmann-Gleichung unter Verwendung der Origin Software (Microcal Software, Northampton, MA, USA) angepasst, um IC<sub>50</sub>-Werte abzuschätzen. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Bestimmungen berechnet.

Vergleich der Inhibition der VR1-Expression durch siRNA und Antisense-Oligonukleotide

Es wurden in einer Säugerkulturzelllinie die Inhibitionswirkungen bezüglich der  
5 Expression von VR1 (hier: Vr1-GFP-Fusionsprotein) von VR1-spezifischer siRNA und 18-meren Antisense-ODN gegen die Zielstelle V30 verglichen, wobei letztere als vollständig Phosphorthioat-modifiziertes Konstrukt, als 2'-O-Methyl- oder als LNA-Gapmer vorlagen. Das VR1-GFP-Plasmid wurde zusammen mit den verschiedenen Antisense-Molekülen bzw. mit der siRNA im nanomolaren Konzentrationsbereich cotransfiziert.  
10

Alle erfindungsgemäßen siRNA-Spezies führten zu einem Antisense-Effekt (Inhibition der VR1-Expression) von deutlich über 50%. Vier der sechs verwendeten Beispielkonstrukte (VsiRNA1, VsiRNA2, VsiRNA3 und VsiRNA5, vgl. vorstehende  
15 Tab. 2) führten zu einer Inhibition der VR1-Expression von weit über 80%. Die erfindungsgemäße siRNA mit dem stärksten Antisense-Effekt (VsiRNA1) wurde für die folgenden Vergleichsexperimente herangezogen.

Wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen (Fig. 7A), inhibiert die  
20 siRNA die VR1-GFP-Expression bereits bei einer Konzentration von 10 nM vollständig. Das LNA-Gapmer führt erst bei einer Konzentration von 25 nM zu einer weitgehenden Herrunterregulation der VR1-GFP-Expression. Eine partieller Antisense-Effekt konnte beim Phosphorthioat-modifizierten ODN bei höherer Konzentration beobachtet werden, während das 2'-O-Methyl-modifizierte Oligonukleotid im beobachteten Konzentrationsbereich keine Suppression der VR1-GFP-Expression hervorrief.  
25

Die Antisense- und siRNA-Experimente wurden durch Western-Blot genauer analysiert (Fig. 7B). Zum Vergleich wurden Oligonukleotide identischer Ausgestaltung, aber invertierter Sequenz verwendet. Die Western-Blot-Experimente bestätigen die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Ergebnisse. Somit ergaben beide Vorgehensweisen – Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot – für  
30

das jeweilige Konstrukt die gleiche Reihenfolge der Effizienz der Blockierung der VR1-Genexpression: siRNA > LNA-Gapmer > Phosphorthioat-ODN > 2'-O-Methyl-modifiziertes Oligonukleotid.

## 5 Abschätzung von IC<sub>50</sub>-Werten

Um das Potential der verschiedenen Strategien – siRNA versus Antisense-ODN – zu quantifizieren, wurden IC<sub>50</sub>-Werte mit Hilfe von Experimenten im geeigneten Konzentrationsbereich für die siRNA bzw. jedes Antisense-Oligonukleotid durchgeführt (Fig. 8). Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung (Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen) sind in Fig. 9 gezeigt. Die IC<sub>50</sub>-Werte sind in der Tab. 3 zusammengefasst.

15 **Tab. 3:** IC<sub>50</sub>-Schätzwerte (Einzelbestimmungen dreier unabhängiger Experiments, deren Mittelwerte und Standardabweichungen)

	IC <sub>50</sub> , 1. Exp. [nM]	IC <sub>50</sub> , 2. Exp. [nM]	IC <sub>50</sub> , 3. Exp. [nM]	IC <sub>50</sub> , Mittelwert [nM]
Thio	48,9	61,0	85,7	70 ± 20
LNA	0,47	0,34	0,37	0,4 ± 0,07
2'-Ome	211,4	197,5	264,8	220 ± 10
SiRNA	0,043	0,065	0,081	0,06 ± 0,02

Wie bereits anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analyse und der Inaugenscheinnahme der Ergebnisse der Western-Blot-Experimente festgestellt werden konnte, zeigt die erfindungsgemäße siRNA ein extrem hohes Potential bezüglich der Inhibition der VR1-Expression, wobei bereits ein signifikanter Effekt bei einer Konzentration von nur 0,05 nM auftritt und ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,06 nM gemessen wird. Im Vergleich mit üblicherweise verwendeten Phosphorthioat-modifizierten Antisense-ODN erweist sich damit die erfindungsgemäße siRNA als etwa 25 1000fach wirksamer. Das im Vergleich zu üblichen Antisense-Oligonukleotiden bereits optimierte LNA-Gapmer ist der erfindungsgemäßen siRNA mit einem

6,5fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert ebenfalls deutlich unterlegen, während die siRNA mehr als 3000fach stärker wirkt als das 2'-O-Methyl-Gapmer.

5

### Beispiel 6

#### *Wirksamkeit von siRNA gegen VR1 bei der Schmerzbehandlung in vivo*

10 Schmerzmodell der Ratte nach Bennett

Die analgetische Wirkung der erfindungsgemäßen siRNA von Beispiel 5 wurde im Ratten-Modell *in vivo* untersucht.

- 15 Neuropathischer Schmerz tritt u.a. nach Schädigung peripherer oder zentraler Nerven auf und lässt sich dementsprechend tierexperimentell durch gezielte Läsionen einzelner Nerven induzieren und beobachten. Ein Tiermodell ist die Nervenläsion nach Bennett (Bennett und Xie (1988) Pain 33: 87-107). Im Bennett-Modell wird der Ischiasnerv unilateral mit losen Ligaturen versehen. Es ist die Entwicklung von Anzeichen des Neuropathieschmerz zu beobachten und kann mittels thermischer oder mechanischer Allodynie quantifiziert werden.
- 20

- Hierzu wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Janvier, Frankreich) mit einem Gewicht von 140 bis 160 Gramm zunächst mit Pentobarbital (50 mg pro kg Körpergewicht der Ratte Nembutal®, i.p., Sanofi, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Hannover, Deutschland) betäubt. Anschließend wurden einseitige mehrfache Ligaturen am rechten Hauptischiasnerv der Ratten vorgenommen. Hierzu wurde der Ischiasnerv auf der Höhe der Oberschenkelmitte freigelegt und vier lockere Ligaturen (softcat®chrom USP 4/0, metric2, Braun Melsungen, Deutschland) wurden so um den Ischiasnerv gebunden, daß die epineurale Durchblutung nicht unterbrochen wurde. Der Operationstag war Tag 1.

Die Allodynie wurde ab Tag 2 auf einer Metallplatte getestet, die mit Hilfe eines Wasserbads auf eine Temperatur von 4°C temperiert wurde. Die Ratten wurden vor der intravenösen Applikation der jeweiligen Lösung in Gruppen von 9 oder 10 Tieren aufgeteilt.

- 5 Zur Überprüfung der Allodynie wurden die Ratten auf die kalte Metallplatte gesetzt, die sich in einem Plastikkäfig befand. Dann wurde über einen Zeitraum von zwei Minuten vor der Applikation einer Lösung gezählt, wie häufig die Tiere mit ihrer geschädigten Pfote von der gekühlten Metallplatte heftig zurückzucken (Vorwert). Dann wurden die Lösungen, enthaltend 3,16 µg (5 µl) erfindungsgemäße siRNA in 15 µl NaCl oder 3,16 µg (5 µl) Kontroll-RNA (Sense-Strang der siRNA) in 15 µl NaCl i.t. appliziert, und die Anzahl der Wegziehreaktionen wurde jeweils nach 60 min wiederum für 2 min gezählt (Testwert). Die Messungen wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (Tage 2 bis 5) durchgeführt. Tiere, denen reine NaCl-Lösung appliziert wurde, dienten sowohl bei den Experimenten mit siRNA als auch mit Kontroll-RNA als Vergleichsgruppe.

15

Die erfindungsgemäße siRNA zeigte in diesem Schmerzmodell eine starke analgetische Wirkung, wie die Verminderung der Wegziehreaktionen von bis zu etwa 1/3 gegenüber der NaCl-Kontrolle an den Tagen 2 bis 4 zeigt (Fig. 10A). Im Vergleich dazu war die Kontroll-RNA unwirksam (Fig. 10B). Eine einmalige i.t.-Gabe von 1ng siRNA führt zu einer deutlichen und langanhaltenden anti-allodynischen Wirkung in der Kälte-Allodynie.

### Beispiel 7

25

#### Kinetische Analyse mit langer Ziel-RNA ("long target RNA")

Die kinetischen Experimente mit "long target RNA" wurden in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 U/µl RNAsin durchgeführt, um unspezifische RNA-Degradation zu vermeiden. Die DNAzyme wurden für 2 Minuten bei 65°C denaturiert und dann auf 37°C gekühlt. Die Reaktionen wurden durch Hinzugabe von DNAzym zu 100

nM „long target“ Lösung gestartet. Die Enzymkonzentration für einzelne und multiple "turn over" Experimente waren 1 $\mu$ M und 10 nM. Aliquots wurden nach definierten Intervallen während der ersten 10% der Reaktion im Falle multipler "turn over" Bedingungen und während einer verlängerten Periode für Einzel-"turn over"-Untersuchungen abgenommen. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 83 mM EDTA und Eiskühlung gestoppt. Die Spaltungsreaktionen wurden durch Agarosegelektrophorese und Ethidiumbromid-Markierung analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mit Hilfe der Quantity One Software (Bio-Rad, München, Deutschland) quantifiziert. Die Daten wurden weiter durch "fitting" analysiert (entweder linear zum Erhalt einer initialen Geschwindigkeit  $v_{init}$  für Substratüberschüßexperimente oder mit einer Einzelexponentialfunktion zum Erhalt der beobachteten Spaltungsgeschwindigkeit für Enzymüberschüßexperimente und Verwendung von Origin (Microcal Software, Northampton, MA). Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

15

#### Stabilitätsassay

Resistenz gegenüber nukleolytischem Abbau von verschiedenen DNAzymen im Zellkulturmedium wurde bewertet. DNAzym (1  $\mu$ M) wurde in DMEM (Cytogen, 20 Sinn, Deutschland), enthaltend 10% FCS (PAA Laboratorien, Linz, Österreich) bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden zu definierten Zeitpunkten zwischen 0 und 72 Stunden abgenommen und die andauernden Reaktionen wurden durch die Hinzugabe von einer gleichen Menge von 9 M Hamstoff in TBE und nachfolgendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff unterbrochen. Die Oligonukleotide wurden Phenol-extrahiert und bei -20°C über Nacht durch Hinzugabe von Natriumacetat, pH 5,2 präzipitiert, so daß eine Endkonzentration von 0,3 M und Zugabe von 2,5 vol Ethanol erfolgte. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in einer geeigneten Menge Wasser resuspendiert. Nach Denaturierung für 5 Minuten bei 85°C wurden Abbauprodukte auf 20%igem denaturierendem Polyacrylamidgel 25 separiert. Weitere Analyse wurde unter Verwendung des Quantity One Programms (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die Halbwertszeiten von 30

40

DNAzym wurden durch "fitting" der Menge des Volllängenoligonukleotids bei verschiedenen Zeitpunkten zu einer Exponentiafunktion erster Ordnung unter Verwendung von Origin (Microcal Software, Nortampton, MA) erhalten.

- 5 Um die Stabilität von DNAzym gegenüber endonukleolytischem Abbau zu messen, wurden 2 µM Oligonukleotide mit 0,4 U S1 Endonuklease (Promega, Madison, WI) pro 100 pmol DNAzym im Puffer des Herstellers (50 mM Natriumacetat, pH 4,5, 280 mM NaCl, 4,5 mM ZnSO<sub>4</sub>) inkubiert. Aliquots wurden nach definierten Zeiten in Intervallen zwischen 0 und 180 Minuten abgenommen. Die Reaktionen
- 10 wurden durch Erhitzung auf 98°C für 3 Minuten und nachfolgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff unterbrochen. Die Oligonukleotide wurden durch Ethanol präzipitiert und weiterbehandelt, wie oben für den Stabilitätsassay im Zellkulturmedium beschrieben. Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte ± Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

15

20

Tab.4

<i>DNAzym</i>	<i>Armlänge</i>	<i>Modifikation</i>	<i>T<sub>M</sub></i> (°C)	<i>k<sub>obs</sub></i> (min <sup>-1</sup> )	<i>v<sub>init</sub></i> (nM*min <sup>-1</sup> )
DH5-9/0	9	keine	32	0.057±0.005	0.21±0.03
DH5-7/0	7	keine	n.d. (<25)	0.033±0.002	n.d. (<0.05)
DH5-iT	9	invertiertes T am 3' Ende	33	0.052±0.005	0.19±0.01
DH5-Thio	9	all-Phosphorothioat Bin-dungsarme	27	0.009±0.001	n.d.(<0.05)
LH5-9/4	9	4 LNA Endblöcke	63	0.24±0.02	0.08±0.02
LH5-7/3	7	3 LNA Endblöcke	48	0.45±0.01	1.2±0.1
LH5-7/4	7	4 LNA Endblöcke	61	0.44±0.05	0.45±0.09
DH5-OMe9/4	9	4 OMe Endblöcke	47	0.11±0.01	1.2±0.1
DH5-OMe8/4	8	4 OMe Endblöcke	44	0.29±0.01	2.8±0.5
DH5-OMe7/3	7	3 OMe Endblöcke	32	0.12±0.03	3.8±0.3
DH5-OMe7/4	7	4 OMe Endblöcke	37	0.31±0.01	4.7±0.4
DH5-OMe7/5	7	5 OMe Endblöcke	39	0.5±0.1	4.7±0.9
DH5-OMe7/6	7	6 OMe Endblöcke	44	0.23±0.06	1.9±0.5
DH5-OMe7/7	7	7 OMe Endblöcke	47	0.027±0.006	0.21±0.02
DH5-OMe6/5	6	5 OMe Endblöcke	26	0.17±0.01	1.1±0.2
DH5-CM6	9	6 OMe im katalytischen Zentrum	31	0.06±0.01	0.09±0.01
DH5 E	7	5 OMe Endblöcke; 6 OMe im katalytischen Zentrum	39	0.57±0.07	2.0±0.2
DV15 9/0	9	keine	37	0.9±0.1	0.5±0.1
DV15-OMe 7/5	7	5 OMe Endblöcke	40	0.83±0.07	1.7±0.2
DV15-CM6	9	6 OMe im katalytischen Zentrum	36	0.43±0.03	0.8±0.2
DV15 E	7	5 OMe Endblöcke; 6 OMe im katalytischen Zentrum	37	0.05±0.01	n.d.(<0.05)
DV15 E4	7	4 OMe Endblöcke, 6 OMe im katalytischen Zentrum	36	0.31±0.08	1.3±0.2

In Tabelle 4 sind die untersuchten DNAzyme mit ihrer jeweiligen Armlänge und den entsprechend vorgenommen Modifikationen dargestellt. Weiterhin enthält Tabelle 4 den Schmelzpunkt ( $T_m$  (°C)) und die beobachteten Spaltungsgeschwindigkeiten (min<sup>-1</sup>) ( $k_{obs}$ ) in Einzel-"turn over"-Experimenten und die initialen Ge-

schwindigkeiten ( $v_{init}$ ) in multiplen „turn over“ Experimenten (jeweils mit "long target" RNA). In den Bezeichnungen der DNAzyme ist vor dem Schrägstrich jeweils die Anzahl der Nukleotide in jedem Bindungsarm genannt. Die Angabe nach dem Schrägstrich bezieht sich auf die Anzahl der modifizierten Nukleotide in jedem Bindungsarm. Die Abkürzung OMe steht für die 2'-O-Methyl-Modifikation. Die Abkürzung iT steht für 3'-invertiertes Thymidin. Thio bedeutet, daß die Bindungsarme alle Phosphorthioate enthalten. L steht für LNA-Modifikation.  $T_m$  gibt die Schmelztemperaturen der Zielmolekül/Enzym-Duplexe an.

10

Tab. 5

	$v_{init}$	$t_{1/2}$ Medi-um	$t_{1/2}$ S1-Nucl.	Performance index
DH5-9/0	1	1	1	1
DH5-Thio	<0.23	11.5	1.6	<4
DH5-iT	0.9	11.5	1	10
DH5-OMe7/5	22.4	3.5	1	78
LHS-7/3	5.7	9.5	1.5	81
DH5 E	9.7	12.5	2.1	255

15

Tabelle 5 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse für verschiedene modifizierte DNAzyme im Vergleich. Hierbei ist die Initialgeschwindigkeit unter den verschiedenen turn over Bedingungen, nämlich im Zellkulturmedium und die Stabilität gegenüber Endonuklease S1 angegeben. Alle Werte sind normalisiert gegenüber unmodifiziertem DNAzym. Ein Index des Gesamtergebnisses der modifizierten DNAzyme aus drei Werten ist in der letzten Spalte angegeben. In Hinblick auf die verwendeten Abkürzungen wird auf Tabelle 4 bzw. die zugehörigen Erläuterungen verwiesen.

## Patentansprüche

- 5        1. DNA-Enzym vom Typ 10-23, umfassend von 5' nach 3' einen ersten Substraterkennungsarm (Abschnitt I), eine katalytische Kernsequenz (Abschnitt II) und einen zweiten Substraterkennungsarm (Abschnitt III), wobei eines oder mehrere der Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 des Abschnitts II modifiziert ist/sind.
- 10        2. DNA-Enzym nach Anspruch 1, wobei alle der Nukleotide 2, 7, 8, 11, 14 und 15 des Abschnitts II modifiziert sind.
- 15        3. DNA-Enzym nach Anspruch 1 oder 2, wobei eines oder mehrere der Nukleotide des Abschnitts I und/oder des Abschnitts III modifiziert ist/sind.
- 20        4. DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das/die modifizierte(n) Nukleotid(e) aus der Gruppe, bestehend aus Phosphorthioat-Nukleotiden, invertiertem Thymidin, 2'-O-Methyl-Ribonukleotiden und LNA-Ribonukleotiden, ausgewählt ist/sind.
- 25        5. DNA-Enzym nach Anspruch 3 oder 4, wobei 3 bis 5 Nukleotide des Abschnitts I und/oder des Abschnitts III modifiziert sind.
- 30        6. DNA-Enzym nach Anspruch 5, wobei sich die modifizierten Nukleotide am 5'-Ende des Abschnitts I und/oder am 3'-Ende des Abschnitts III befinden.

7. DNA-Enzym nach Anspruch 5 oder 6, wobei die modifizierten Nukleotide des Abschnitts I und/oder des Abschnitts III 2'-O-Methyl-Ribonukleotide oder LNA-Ribonukleotide sind.
- 5 8. DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Abschnitt I und/oder der Abschnitt III nicht mehr als 8 Nukleotide umfasst.
9. DNA-Enzym nach Anspruch 8, wobei der Abschnitt I und/oder der Abschnitt III 7 Nukleotide umfasst.
- 10 10. DNA-Enzym nach Anspruch 3 oder 4, wobei alle Nukleotide des Abschnitts I und/oder des Abschnitts III Phosphorthioat-Nukleotide oder 2'-O-Methyl-Ribonukleotide sind.
- 15 11. DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei die Schmelztemperatur der zwischen den Abschnitten I und III und dem Zielmolekül gebildeten Doppelstränge etwa 33 bis etwa 42°C beträgt.
- 20 12. DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Abschnitt II die folgende Konsensussequenz von 5' nach 3' aufweist:  
GGMTMGH (N) DNNNMGD  
mit        M = A oder C;  
            H = A, C, oder T;  
            D = G, A oder T; und  
25        N = irgendeine Base.
13. DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 12, das gegen die mRNA des Vanilloid-Rezeptors 1 (VR1) gerichtet ist.
- 30 14. DNA-Enzym nach Anspruch 13, wobei die Abschnitte I und III von 5' nach 3' die folgenden Sequenzen oder eine in einem Nukleotid davon abweichende Sequenz aufweisen, mit der Maßgabe, daß sich das von

den angegebenen Sequenzen abweichende Nukleotid nicht an einer der letzten drei Positionen des Abschnitts I und nicht an einer der ersten 3 Positionen des Abschnitts III befindet:

	Abschnitt I	Abschnitt III
5	GTCATGA	GGTTAGG
	TGTCATGA	GGTTAGGG
	ATGTCATGA	GGTTAGGGG
	GTCGTGG	GATTAGG
	TGTCGTGG	GATTAGG
10	ATGTCGTGG	GATTAGG
	TTGTTGA	GGTCTCA
	CTTGTGA	GGTCTCAC
	TCTTGTGA	GGTCTCACC
	TTGTTGA	AGTCTCA
15	CTTGTGA	AGTCTCAN
	TCTTGTGA	AGTCTCANN
	GGCCTGA	CTCAGGG
	CGGCCTGA	CTCAGGGA
	TCGGCCTGA	CTCAGGGAG
20	TGCTTGA	CGCAGGG
	CTGCTTGA	CGCAGGGN
	TCTGCTTGA	CGCAGGGNN
	GTGTGGA	TCCATAG
	GGTGTGGA	TCCATAGG
25	TGGTGTGGA	TCCATAGGC
	ACGTGGA	TCAGACG
	GACGTGGA	TCAGACGN
	CGACGTGGA	TCAGACGNN
	GTGGGGGA	TCAGACT
30	GGTGGGGGA	TCAGACTC
	GGGTGGGGGA	TCAGACTCC

	GTGGGTC	GCAGCAG
	AGTGGGTC	GCAGCAG
	GAGTGGGTC	GCAGCAG
	CGCTTGA	AAATCTG
5	GCGCTTGA	AAATCTGT
	TGCGCTTGA	AAATCTGTC
	CGCTTGA	GAATCTG
	GCGCTTGA	GAATCTGN
	TGCGCTTGA	GAATCTGNN
10	CTCCAGA	ATGTGGA
	GCTCCAGA	ATGTGGAA
	AGCTCCAGA	ATGTGGAAT
	CTCCAGG	AGGTGGA
	GCTCCAGG	AGGTGGA
15	AGCTCCAGG	AGGTGGA
	GGTACGA	TCCTGGT
	GGGTACGA	TCCTGGTA
	CGGGTACGA	TCCTGGTAG
	GGTGCAG	TCTTGGC
20	GGGTGCAG	TCTTGGC
	CGGGTGCAG	TCTTGGC
	mit N = irgendeine Base	

15. siRNA, die gegen eine Zielsequenz der VR1-mRNA gerichtet ist, welche  
25 die allgemeine Struktur 5'-AA (N<sub>19</sub>) TT-3' aufweist.
16. siRNA nach Anspruch 15, wobei die Zielsequenz aus der Gruppe, be-  
stehend aus 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCAACTT-3', 5'-  
AAGUUCGUGACAAGCAUGUACTT-3', 5'-AAGCAUGUACAACGAGAUCUUTT-3',  
30 5'-AACCGUCAUGACAUGCUUCUCTT-3', 5'-AAGAAUAACUCUCUGCCUAUGTT-  
3' und 5'-AAUGUGGGUAUCAUCAACGAGTT-3', ausgewählt ist.

17. siRNA nach Anspruch 16, die aus den folgenden Duplexmolekülen ausgewählt ist:

Sense-Strang/Antisense-Strang

5           5'-GCGCAUCUUCUACUUAACdTdT-3'/5'-GUUGAAGUAGAAGAUGCACdTdT-3',  
5'-GUUCGUGACAAGCAUGUACdTdT-3'/5'-GUACAUUGCUGUCACGAACdTdT-3',  
5'-GCAUGUACAAACGAGAUCUUDdTdT-3'/5'-AAGAUCUCGUUGUACAUUGCdTdT-3',  
5'-CCGUCAUGACAUGCUUCUCdTdT-3'/5'-GAGAAGCAUGUCAUGACGGdTdT-3',  
5'-GAAUAAACUCUCUGCCUAUGdTdT-3'/5'-CAUAGGCAGAGAGUUAUUCdTdT-3' und  
5'-UGUGGGUAUCAUCAACGAGdTdT-3'/5'-CUCGUUGAUGAUACCCACAdTdT-3'.

10

18. Wirtszelle, enthaltend mindestens ein DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und/oder eine siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Wirtszelle keine humane Keimzelle und keine humane embryonale Stammzelle ist.

15

19. Wirtszelle nach Anspruch 18, die eine Säugetierzelle ist.

20. Wirtszelle nach Anspruch 19, die eine humane Zelle ist.

20

21. Verfahren zur Herunterregulation der Expression eines Gens, umfassend das Einbringen mindestens eines DNA-Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 17 in eine das Gen exprimierende Zelle.

25

22. Verfahren nach Anspruch 26, wobei das Gen das VR1-Gen ist und mindestens ein DNA-Enzym nach Anspruch 13 oder 14 in die Zelle eingebracht wird.

30

23. Verfahren zur Herunterregulation der Expression des VR1-Gens, umfassend das Einbringen mindestens einer siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in eine das VR1-Gen exprimierende Zelle.

24. Arzneimittel, enthaltend mindestens ein DNA-Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und/oder eine siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17 und/oder eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 18 bis 20, gegebenenfalls in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch vertäglichen Trägern und/oder Vehikeln.  
5
25. Arzneimittel nach Anspruch 24, enthaltend mindestens ein DNA-Enzym nach Anspruch 13 oder 14 und/oder eine siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17 und/oder eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 18 bis 20.  
10
26. Verwendung des DNA-Enzyms nach Anspruch 13 oder 14 oder der siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17 oder der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Prävention und/oder Behandlung von Schmerz, insbesondere chronischem Schmerz, taktiler Allodynie, thermisch ausgelöstem Schmerz und/oder Entzündungsschmerz.  
15
27. Verwendung des DNA-Enzyms nach Anspruch 13 oder 14 oder der siRNA nach einem der Ansprüche 15 bis 17 oder der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Prävention und/oder Behandlung von neurogenen Blasensymptomen, Harninkontinenz, VR1-assoziierten Sensibilitätsstörungen, VR1-assoziierten Entzündungen und VR1-assoziierten Tumoren.  
20

Fig. 1

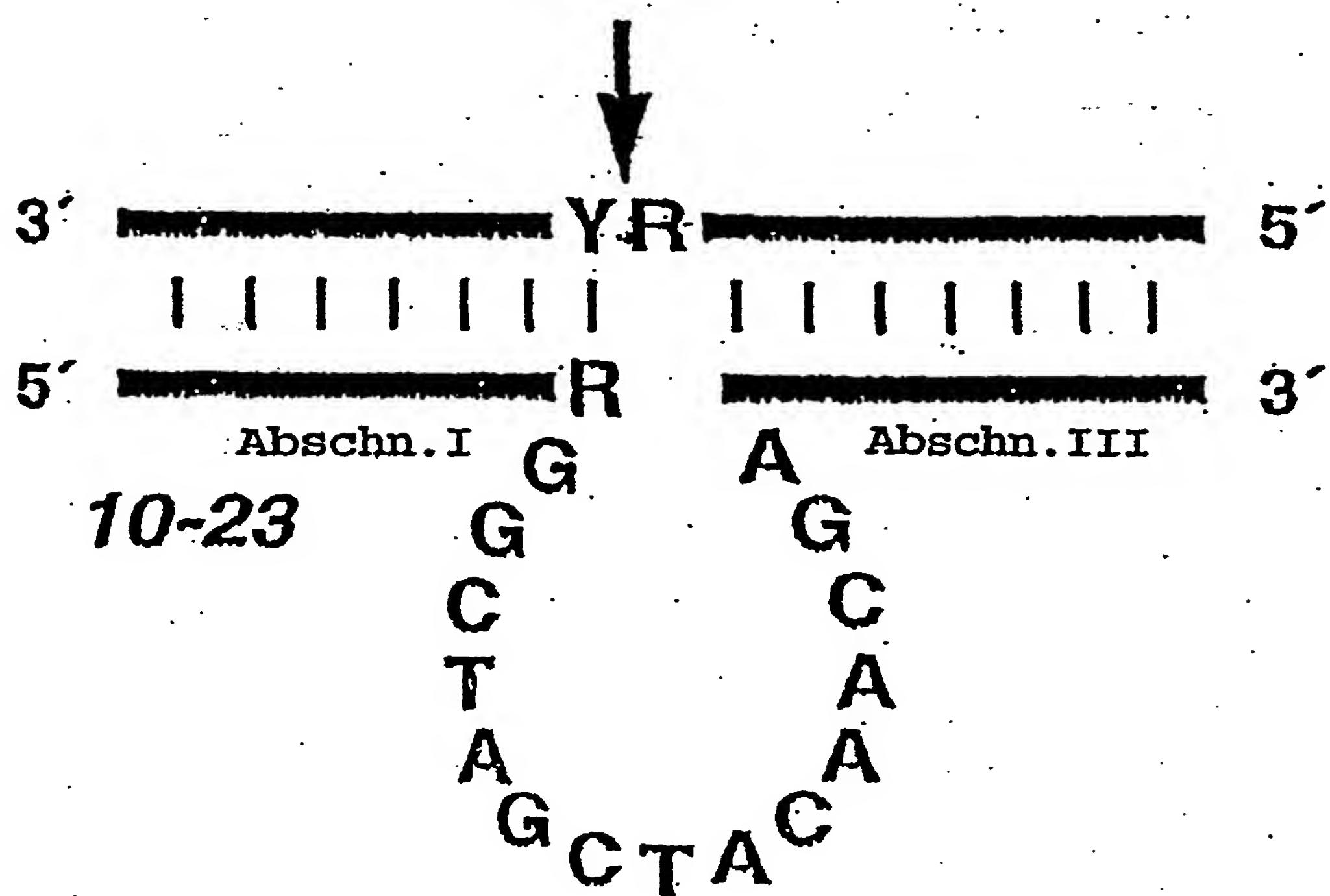


Fig. 2

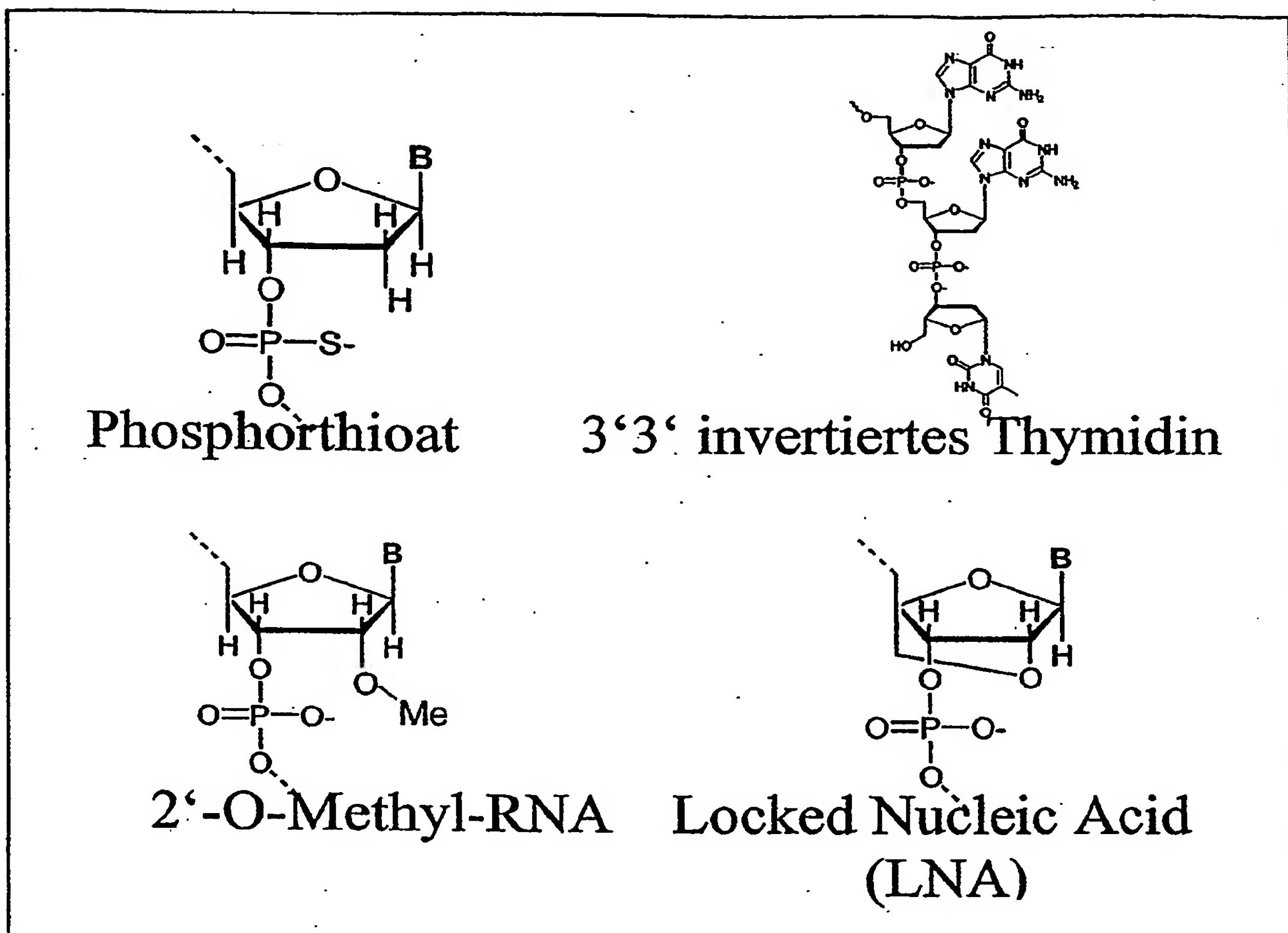


Fig. 3

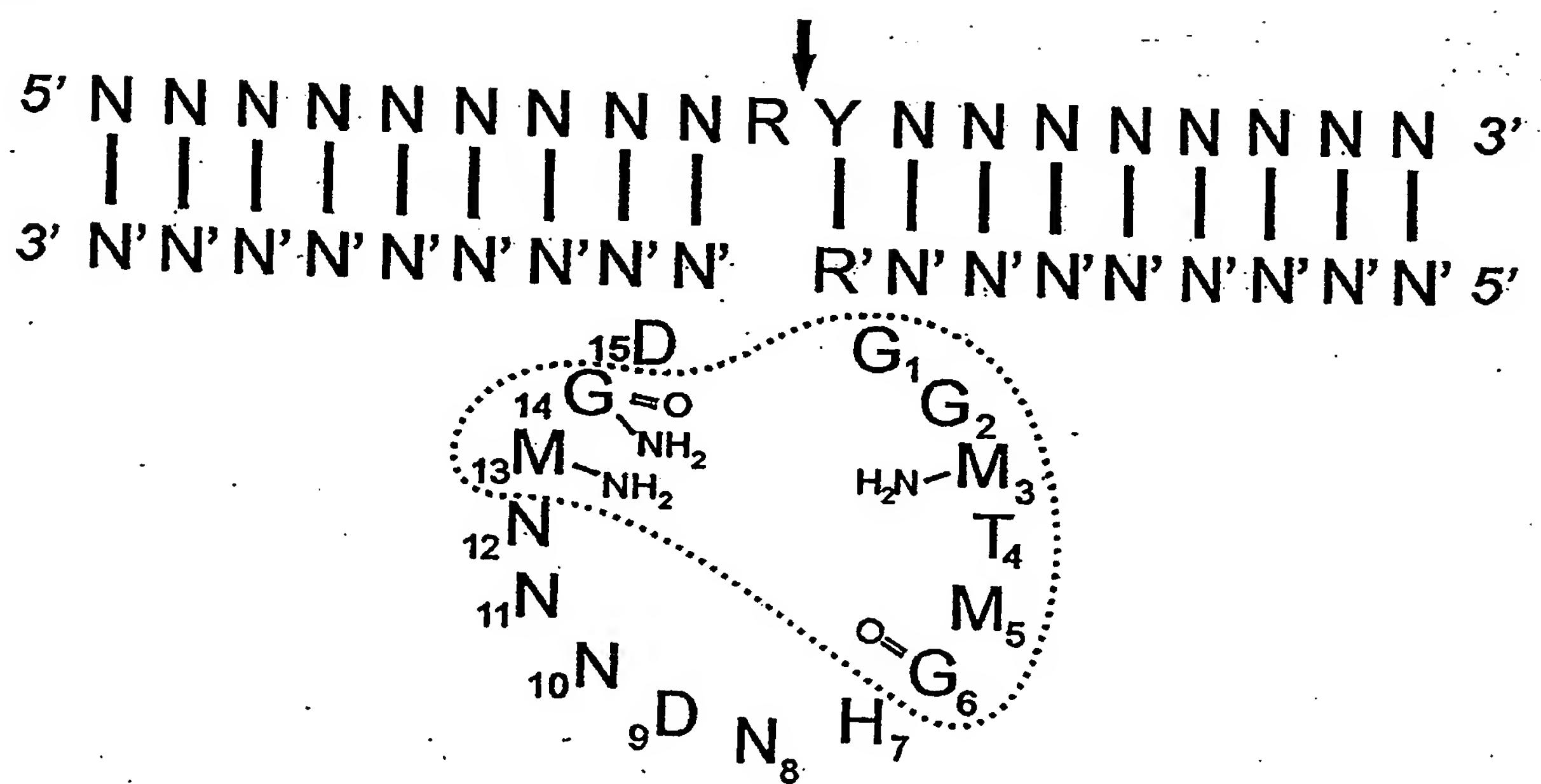
**B**

Fig. 4

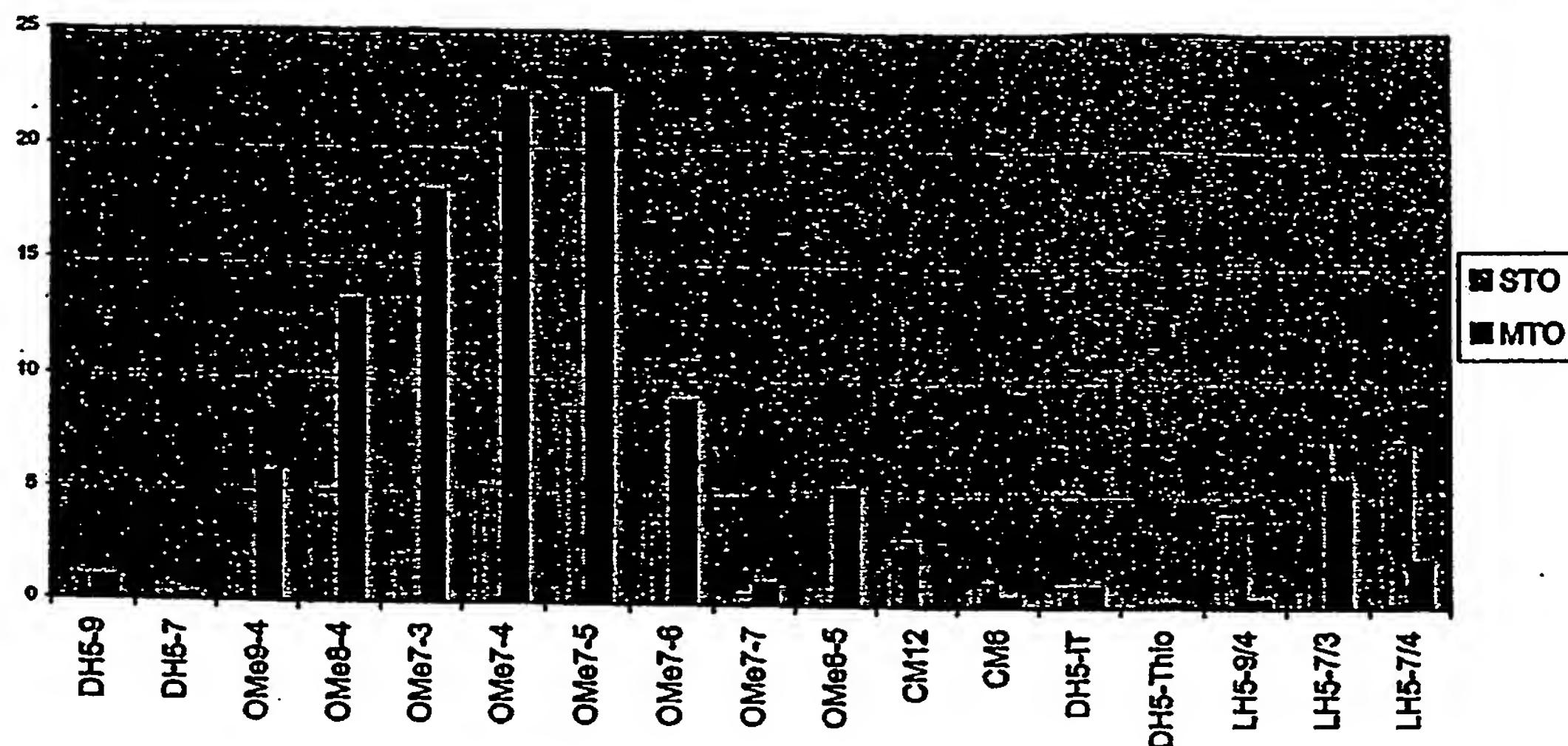
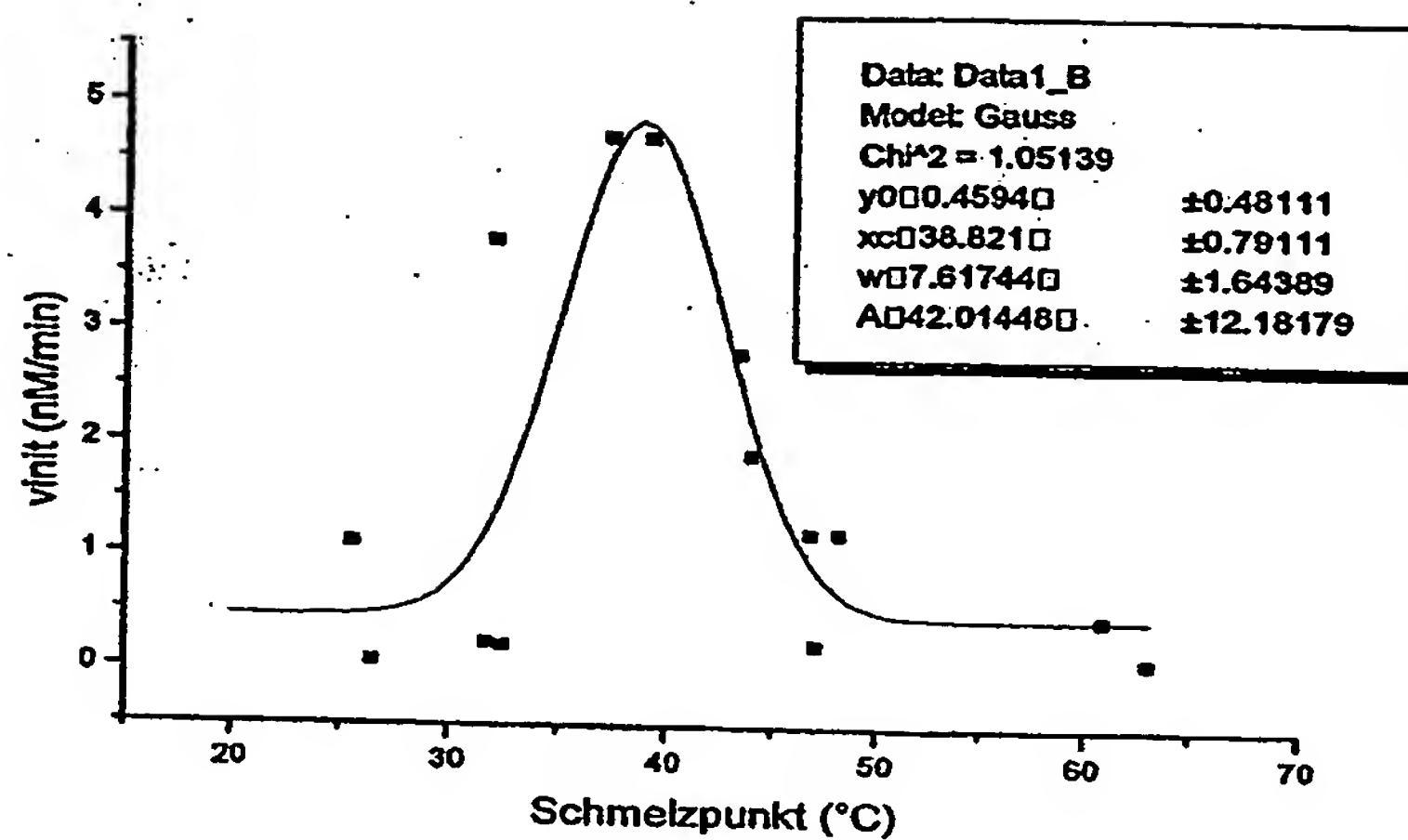


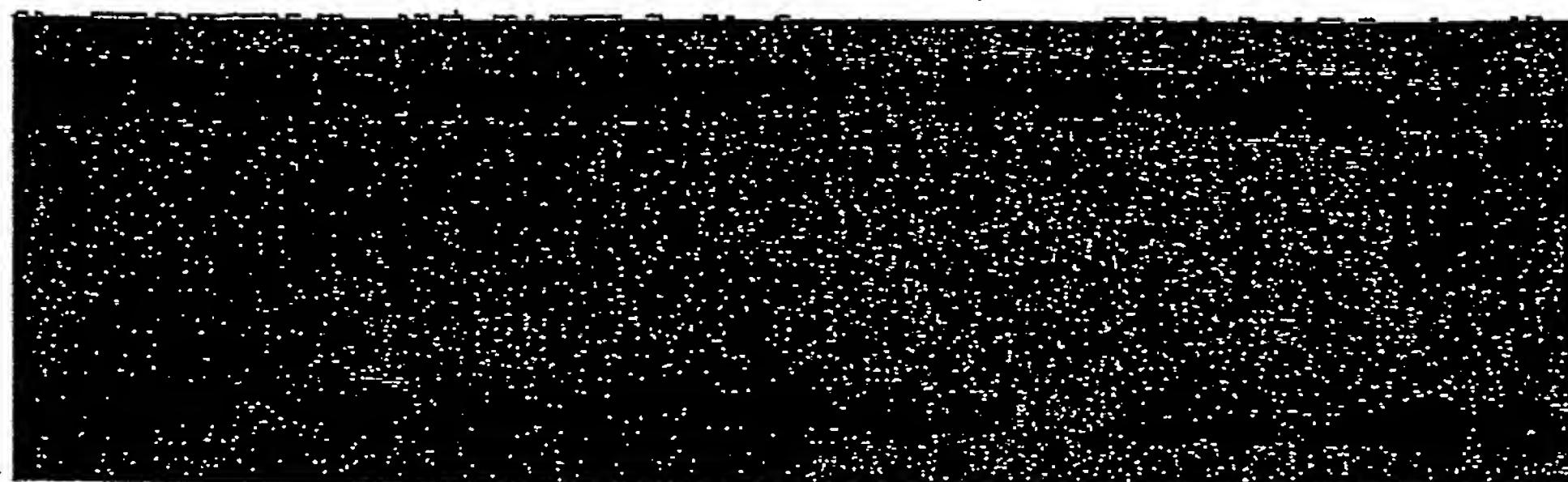
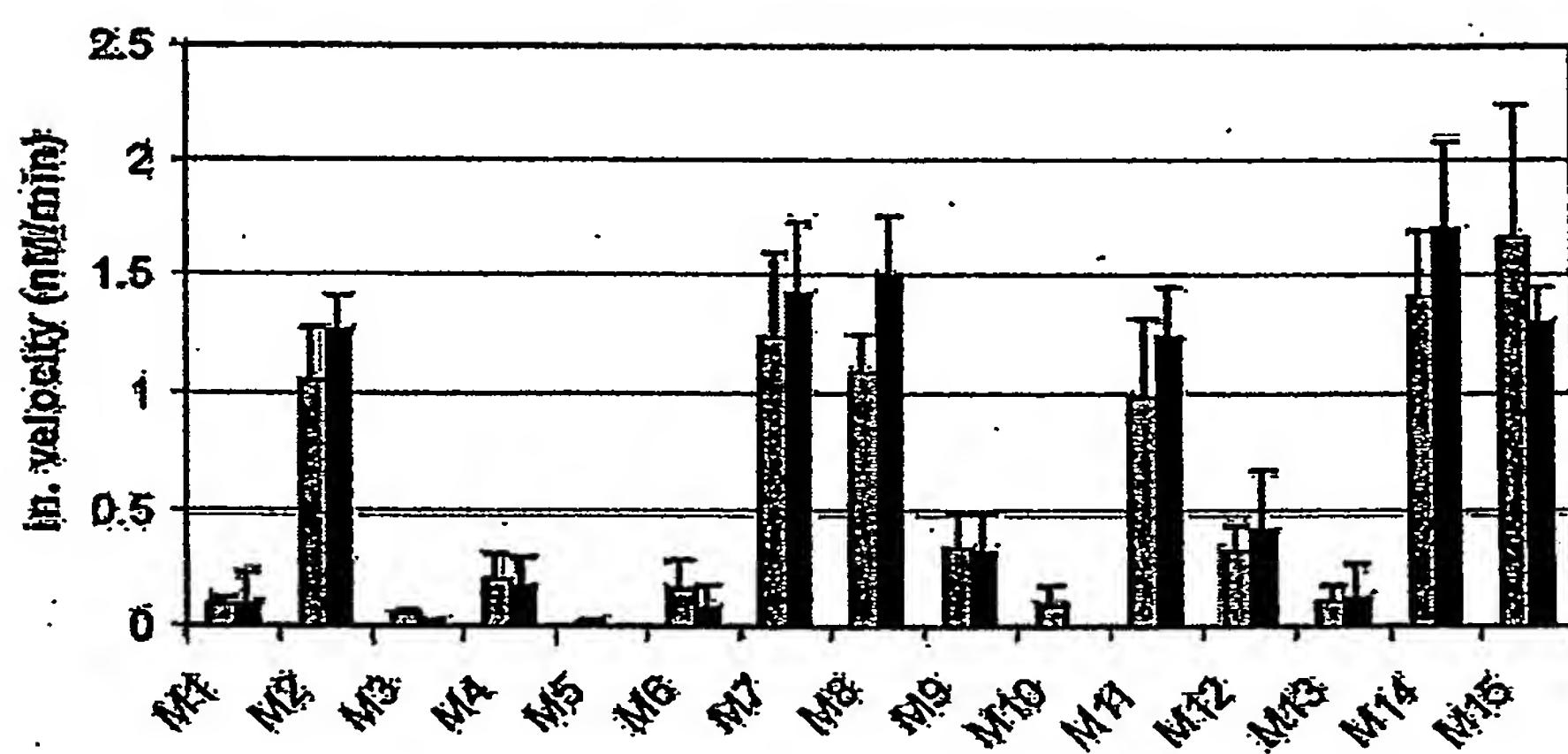
Fig. 5



**A**

Fig. 6

C U  
OMe 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

**B**

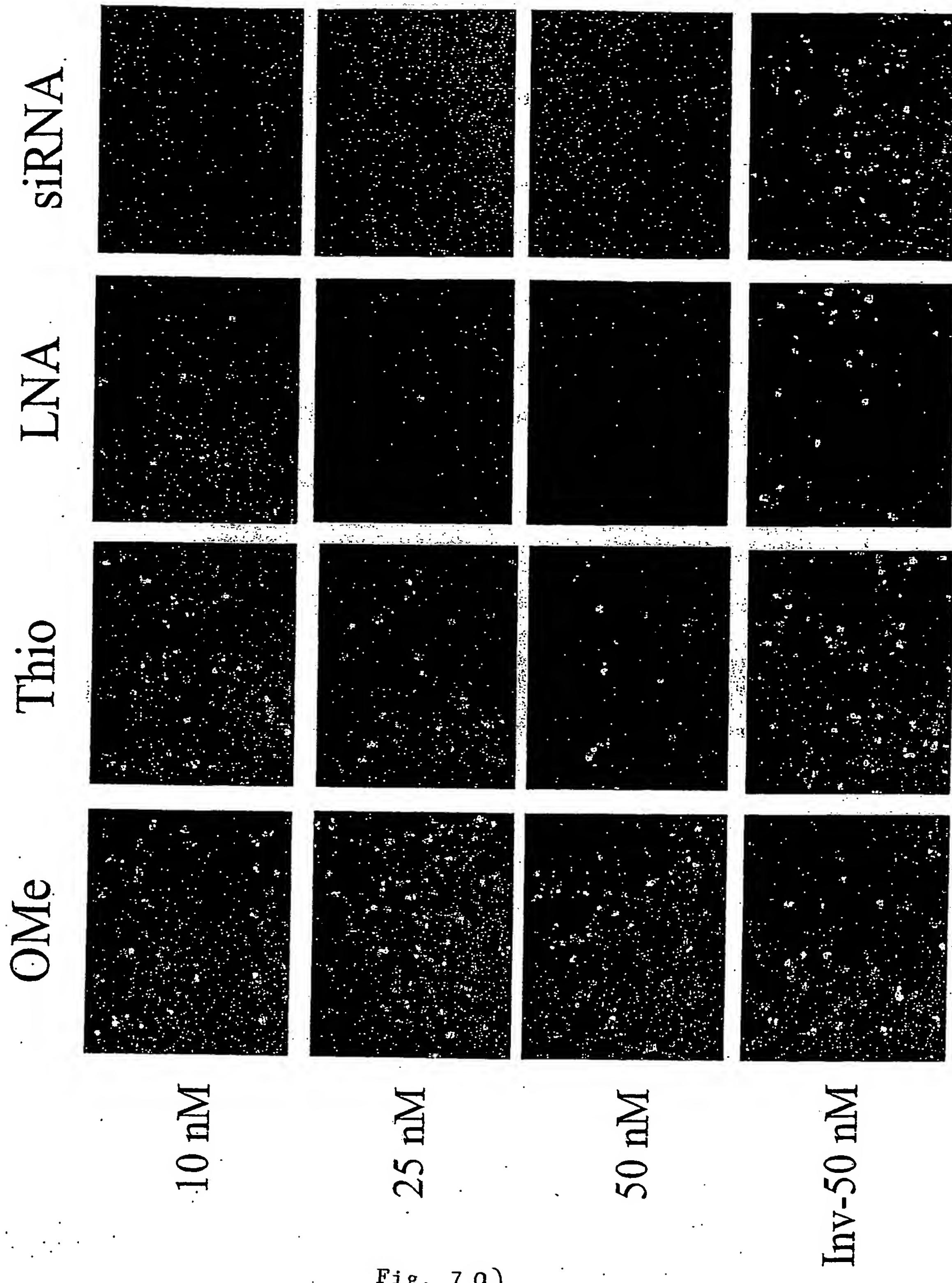


Fig. 7 a)

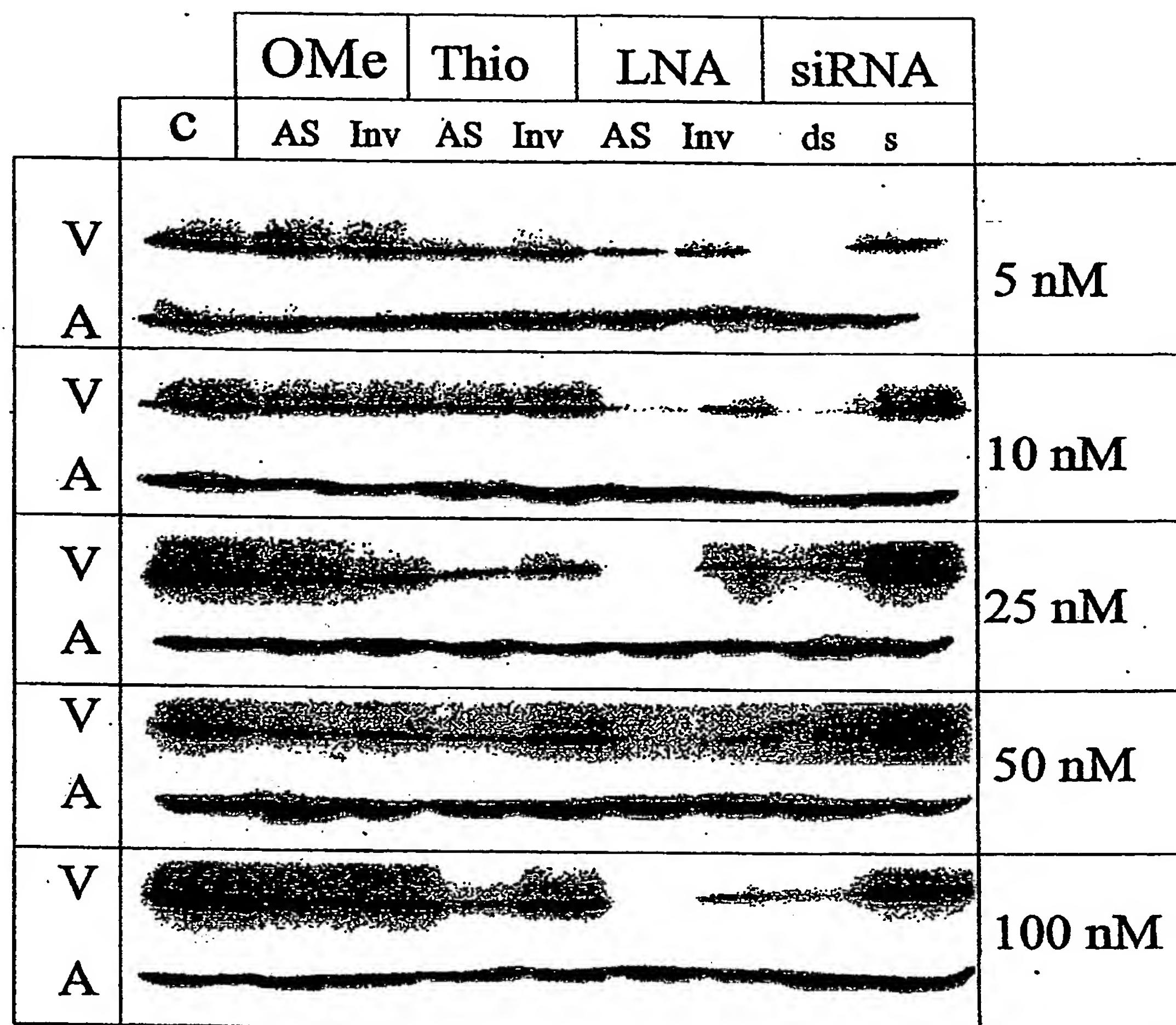


Fig. 7B

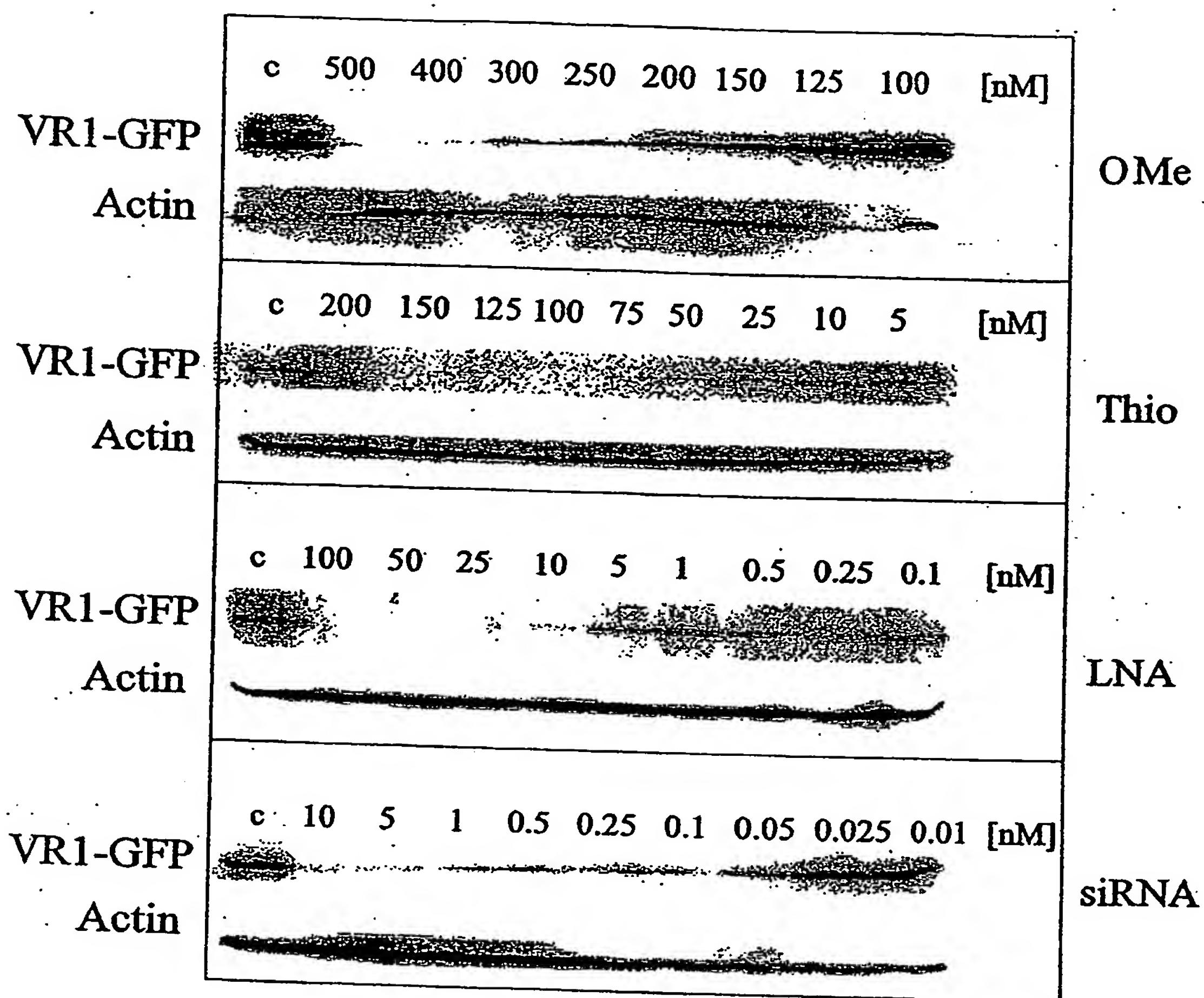


Fig. 8

Fig 9

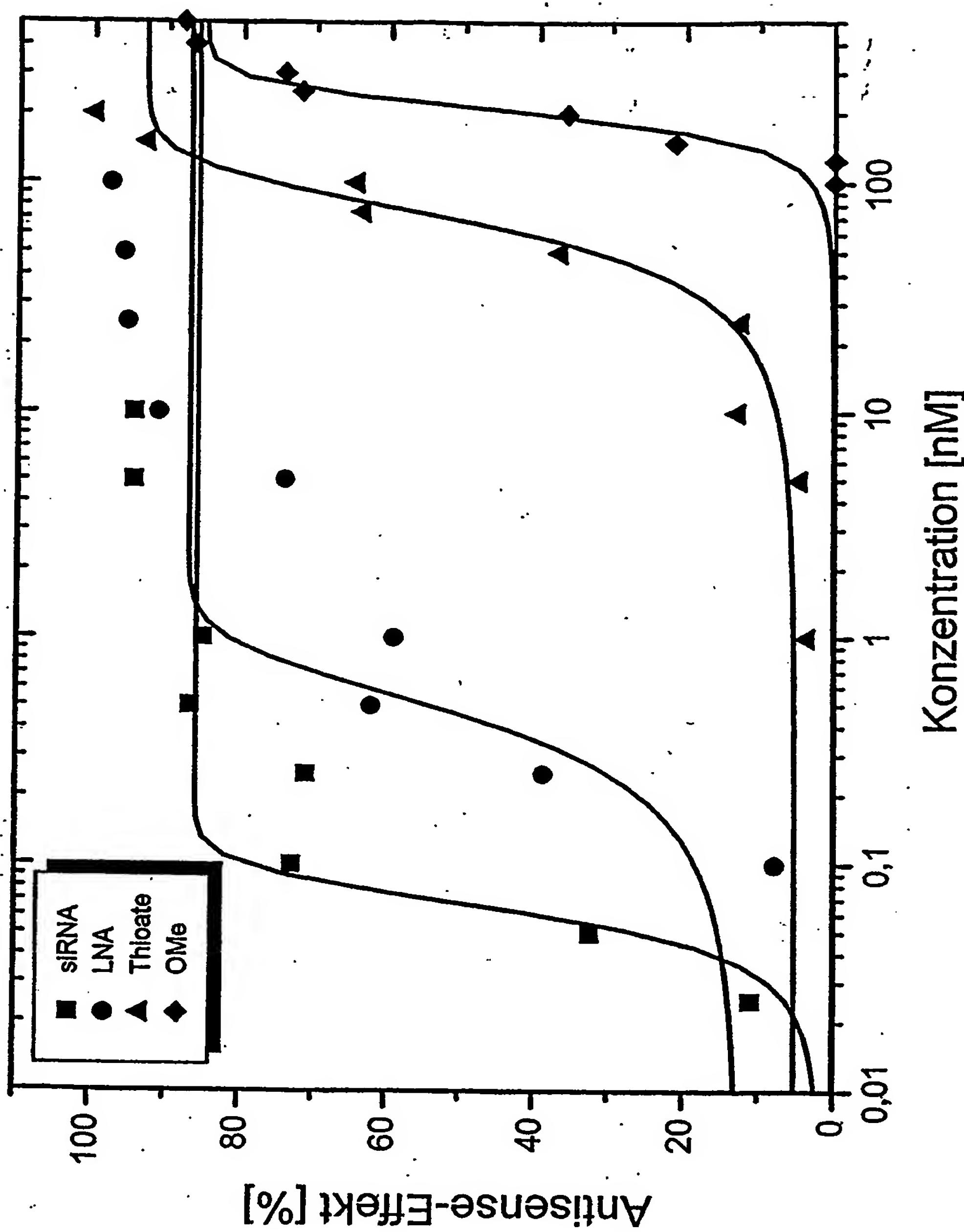


Fig. 10A

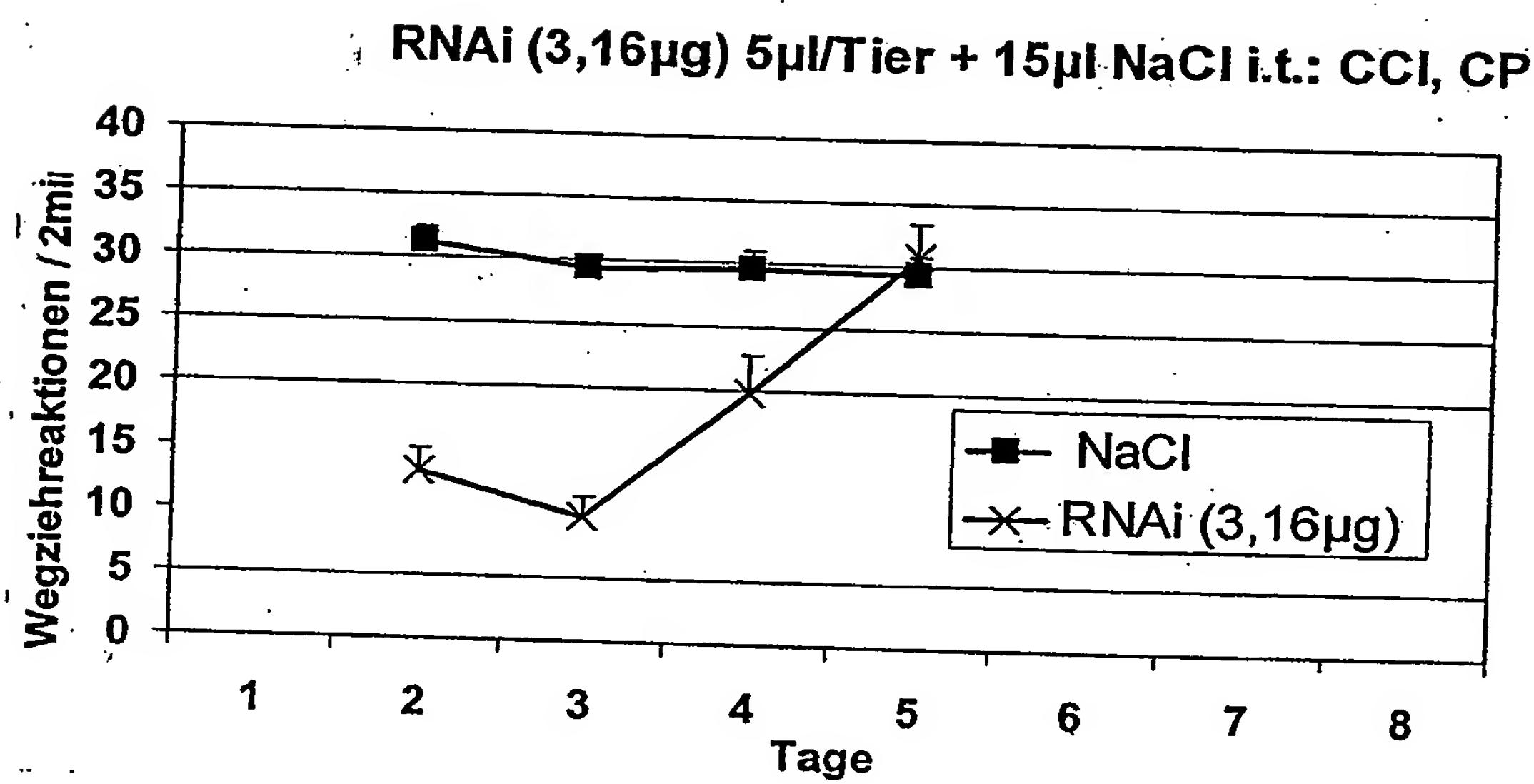
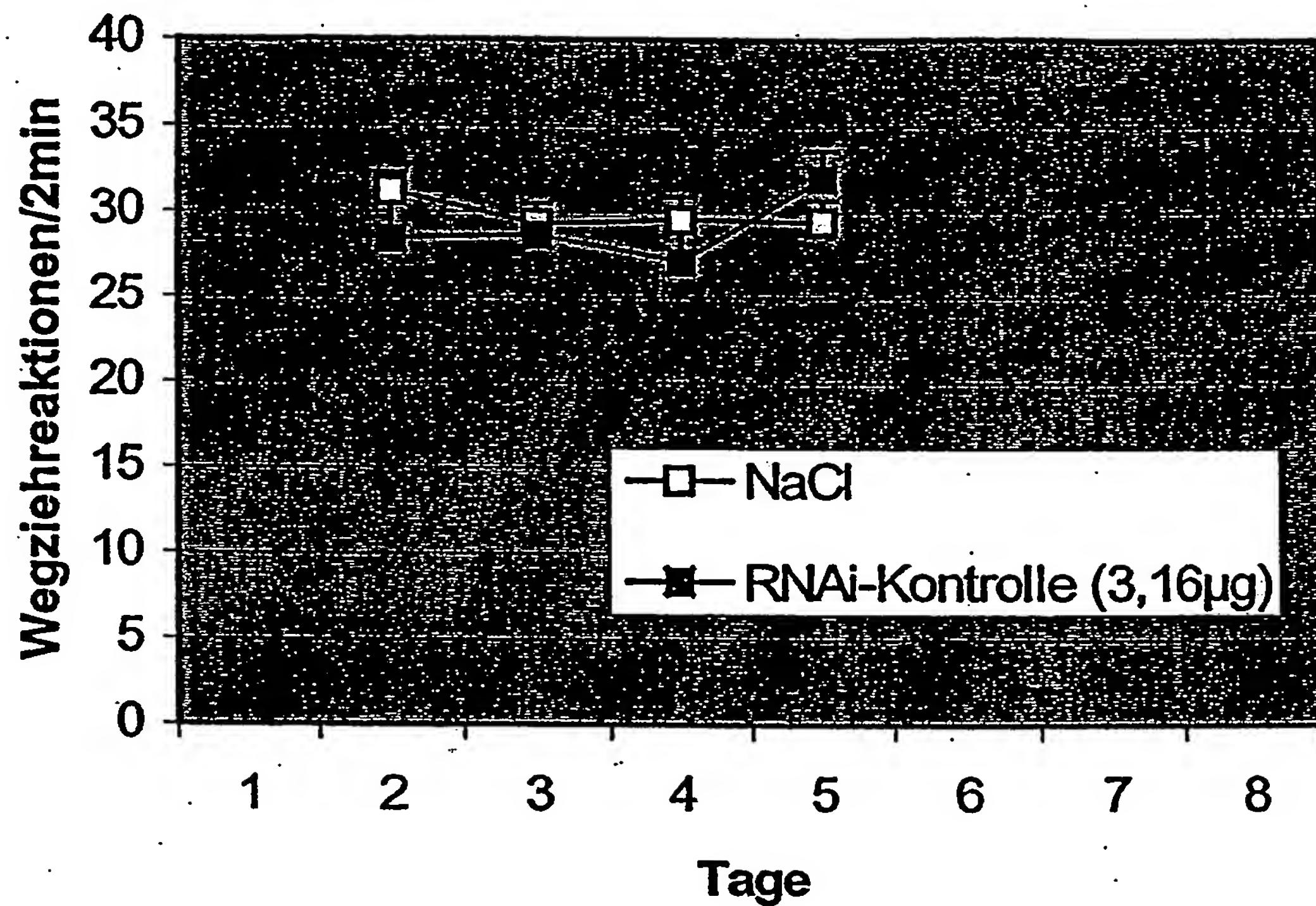


Fig. 10B

**RNAi-Kontrolle (3,16 $\mu$ g) 5 $\mu$ l/Tier + 15 $\mu$ l NaCl i.t.: CCl, CP**



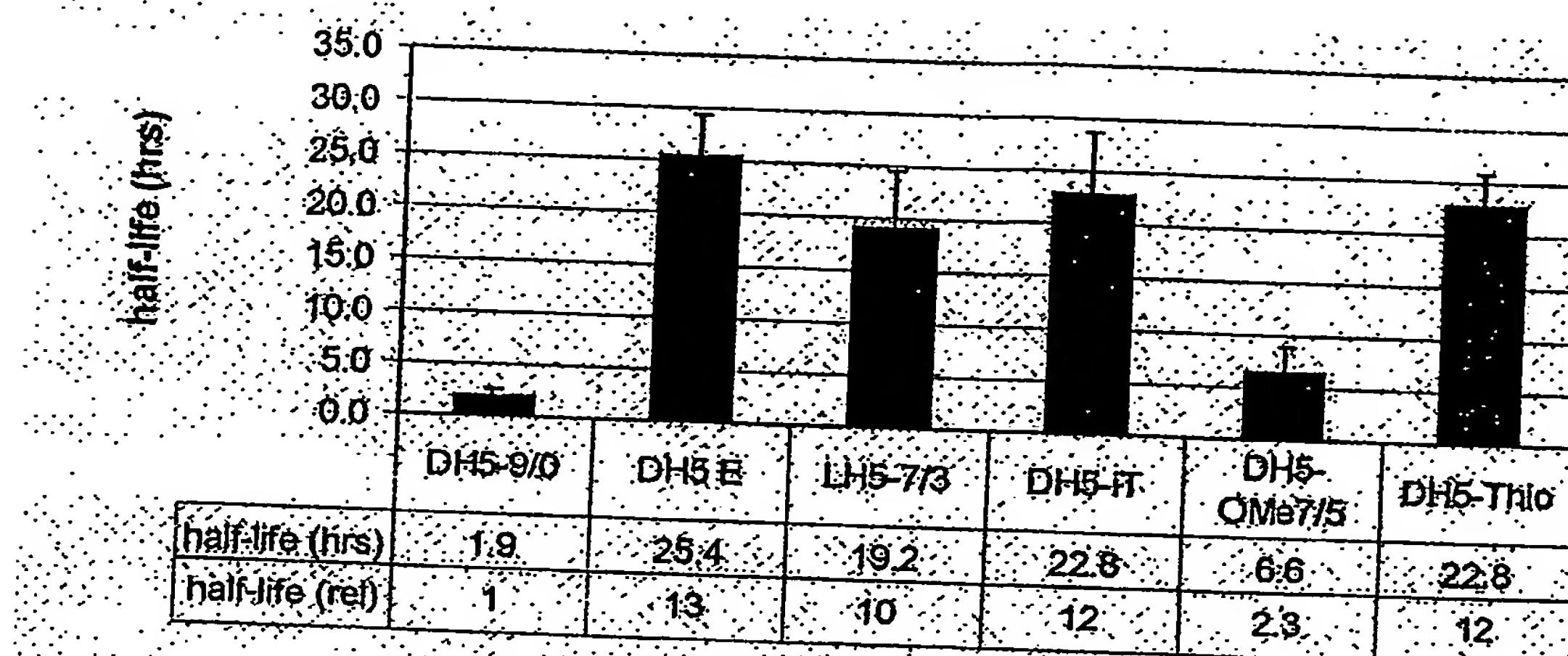
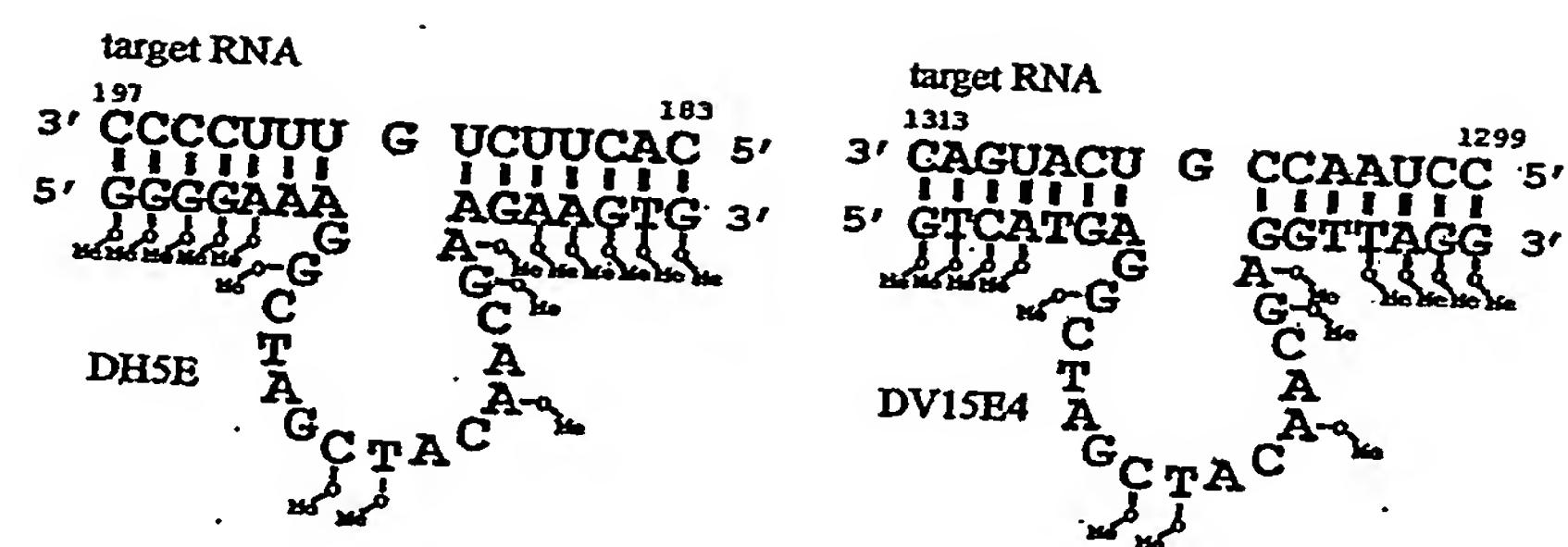


Fig. 11

	$t_{\frac{1}{2}}$ (min)	$f_{\frac{1}{2}}$ (rel)
DH5-9/0	8	1
DH5-IT	8	1
DH5-OMe7/5	8	1
DH5-7/3	13	1.6
DH5-Thio	13	1.6
DH5-E	17	2.1
Time (min)	0    5    15    30    45    60    120    180	

Fig. 12

Fig. 13



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Mai 2004 (21.05.2004)

PCT

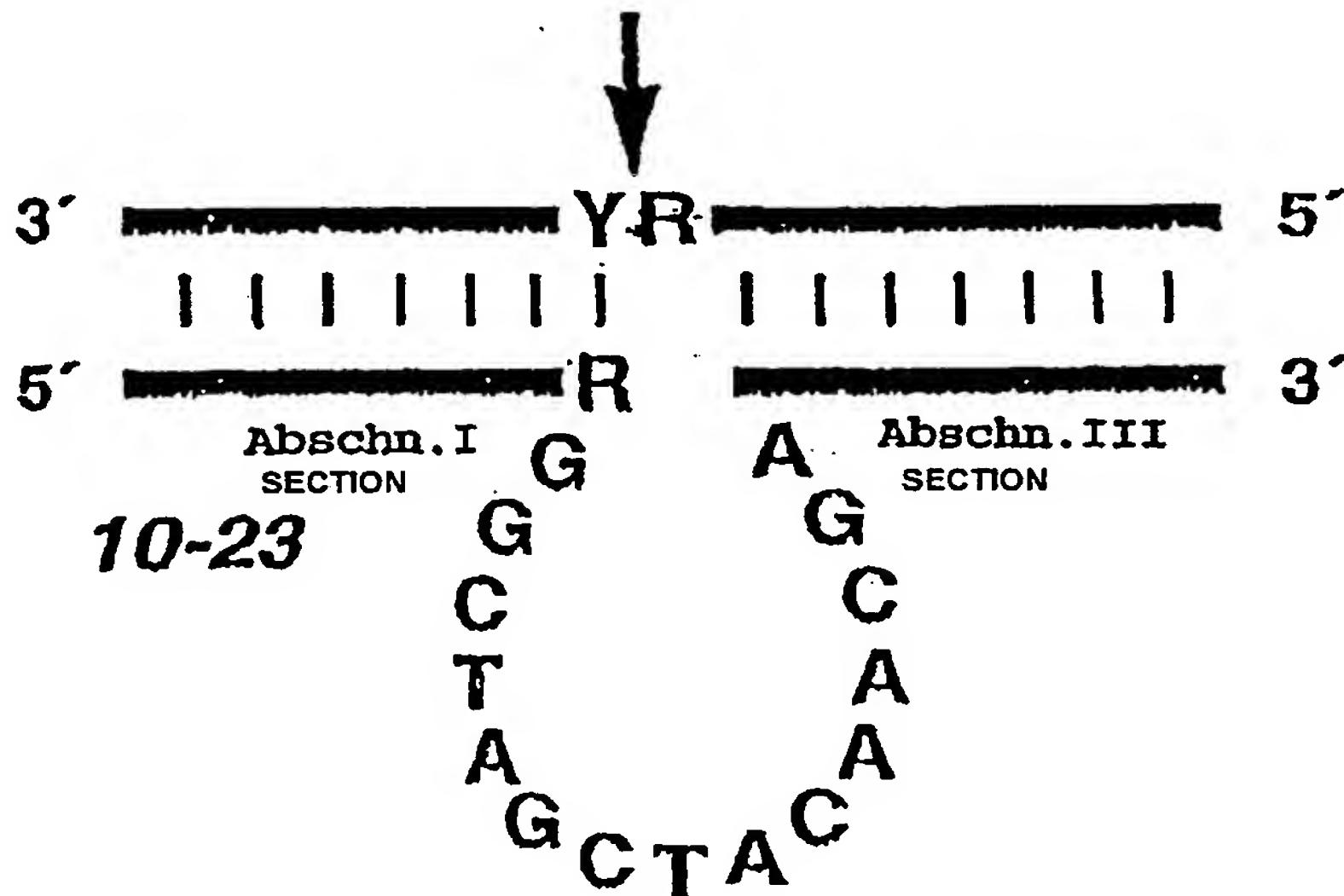
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/042046 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/11, (72) Erfinder; und  
5/10, A61K 31/7088 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHUBERT, Steffen  
[DE/DE]; Seelingstr. 33, 14059 Berlin (DE). KUR-  
RECK, Jens [DE/DE]; Köhlerstr. 12 B, 12205 Berlin  
(DE). GRÜNWELLER, Arnold [DE/DE]; Schützenstr.  
7, 12165 Berlin (DE). ERDMANN, Volker [DE/DE];  
Argentinische Allee 2, 14163 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/012413
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
6. November 2003 (06.11.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.;  
Deutsch (76) Flüggenstr. 13, 80639 München (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 51 682.0 6. November 2002 (06.11.2002) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
103 22 662.1 15. Mai 2003 (15.05.2003) DE AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,  
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): GRÜNENTHAL GMBH [DE/DE]; Zieglerstr. 6,  
52978 Aachen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: EFFECTIVE AND STABLE DNA ENZYMES

(54) Bezeichnung: WIRKSAME UND STABILE DNA-ENZYME



WO 2004/042046 A3

(57) Abstract: The invention relates to DNA enzymes of type 10-23, which are particularly stable as a result of modifications to particular nucleotides in the core sequence and furthermore have an essentially similar or improved cleaving efficiency for the substrate thereof, relative to the unmodified DNA enzyme. The invention further relates to host cells, containing said DNA enzymes. A medicament is also prepared which contains said DNA enzymes or said host cells. The DNA enzyme and further inventions are particularly targeted at the vanilloid receptor 1 (VR1) or picorna viruses. Small interference RNA molecules (siRNA) are also disclosed, targeted at VR1 and the host cells containing the siRNA. The siRNA and corresponding host cells are suitable as medicaments or for the production of medicaments, in particular for the treatment of pain and other disease states associated with VR1.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

30. September 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Enzyme vom Typ 10-23, die durch Modifizierung bestimmter Nukleotide in der Kernsequenz besonders stabil sind und darüber hinaus im wesentlichen die gleiche oder eine höhere Spalteffizienz gegenüber ihrem Substrat aufweisen, wie die entsprechenden nicht-modifizierten DNA-Enzyme. Weitere Gegenstände der vorliegenden Anmeldung betreffen Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme enthalten. Darüber hinaus wird ein Arzneimittel bereitgestellt, welches die erfindungsgemäßen DNA-Enzyme bzw. Wirtszellen enthalten. Die DNA-Enzyme und weiteren Gegenstände sind insbesondere gegen den Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) bzw. Picornaviren gerichtet. Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind kleine Interferenz-RNA-Moleküle (siRNA), die gegen VR1 gerichtet sind, und die siRNA enthaltende Wirtszellen. Die siRNA und entsprechende Wirtszellen eignen sich als Arzneimittel bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Schmerzen und anderen mit VR1 zusammenhängenden krankhaften Zuständen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/12413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/11 C12N5/10 A61K31/7088

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIOUD M ET AL: "Design of nuclease resistant protein kinase calpha DNA enzymes with potential therapeutic application" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 296, no. 3, 25 February 2000 (2000-02-25), pages 937-947, XP004461588 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-6,8-12
Y	-----	7,13,14, 18-22, 24-27
Y	WO 02/18407 A (KURRECK JENS ;ERDMANN VOLKER A (DE); GRUENENTHAL GMBH (DE)) 7 March 2002 (2002-03-07) cited in the application	13,14, 18-22, 24-27
A	the whole document	15-17,23
	-----	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- °A° document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- °E° earlier document but published on or after the international filing date
- °L° document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- °O° document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- °P° document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- °T° later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- °X° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- °Y° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- °8° document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2004

Date of mailing of the international search report

20 JUL 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huse, I

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No  
PCT/EP 03/12413

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WARASHINA M ET AL: "Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome." CHEMISTRY & BIOLOGY. ENGLAND APR 1999, vol. 6, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 237-250, XP002272987 ISSN: 1074-5521 the whole document	7
A	BEIGELMAN L ET AL: "CHEMICAL MODIFICATION OF HAMMERHEAD RIBOZYMES CATALYTIC ACTIVITY AND NUCLEASE RESISTANCE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 43, 27 October 1995 (1995-10-27), pages 25702-25708, XP000601905 ISSN: 0021-9258 page 25702, paragraph 4 figure 1	1-12
P,X	SCHUBERT STEFFEN ET AL: "RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 15 OCT 2003, vol. 31, no. 20, 15 October 2003 (2003-10-15), pages 5982-5992, XP002272988 ISSN: 1362-4962 the whole document	1-14
P,X	GRÜNWELLER ARNOLD ET AL: "Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 15 JUN 2003, vol. 31, no. 12, 15 June 2003 (2003-06-15), pages 3185-3193, XP002286510 ISSN: 1362-4962 abstract table 1 page 3188, right-hand column, line 16 - line 20	15-20,23
A	WO 02/44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE); LEN) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document	15-20, 23-27
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/12413

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOVINA C D ET AL: "siRNA directed inhibition of HIV-1 infection" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 7, no. 8, July 2002 (2002-07), pages 681-686, XP002955298 ISSN: 1078-8956 abstract page 681, right-hand column, line 8 - line 16	15-20, 23-27
A	BRUMMELKAMP T R ET AL: "STABLE SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY VIRUS-MEDIATED RNA INTERFERENCE" CANCER CELL, XX, US, vol. 2, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 abstract	15-20, 23-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 03/12413

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 21 to 23, 26 and 27 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.**
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See the Supplemental Sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 03/12413

**Box I.1.**

Although claims 21 to 23, 26 and 27 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No	
PCT/EP 03/12413	

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0218407	A 07-03-2002	DE DE AU CA WO EP HU JP US	10043674 A1 10043702 A1 9553101 A 2420656 A1 0218407 A2 1313768 A2 0301805 A2 2004507263 T 2004002473 A1	21-03-2002 14-03-2002 13-03-2002 26-02-2003 07-03-2002 28-05-2003 28-08-2003 11-03-2004 01-01-2004
WO 0244321	A 06-06-2002	AU AU BR BR CA CA CZ WO EP EP HU JP NO WO US US	3574402 A 4962201 A 0107536 A 0115814 A 2404890 A1 2429814 A1 20031839 A3 0244321 A2 1309726 A2 1407044 A2 0302557 A2 2003529374 T 20032464 A 0175164 A2 2003108923 A1 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 02-03-2004 23-03-2004 11-10-2001 06-06-2002 15-10-2003 06-06-2002 14-05-2003 14-04-2004 28-10-2003 07-10-2003 21-07-2003 11-10-2001 12-06-2003 04-07-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/12413

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/11 C12N5/10 A61K31/7088

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SIOUD M ET AL: "Design of nuclease resistant protein kinase calpha DNA enzymes with potential therapeutic application" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 296, Nr. 3, 25. Februar 2000 (2000-02-25), Seiten 937-947, XP004461588 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument	1-6, 8-12
Y	WO 02/18407 A (KURRECK JENS ; ERDMANN VOLKER A (DE); GRUENTHAL GMBH (DE)) 7. März 2002 (2002-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	7, 13, 14, 18-22, 24-27
Y	WO 02/18407 A (KURRECK JENS ; ERDMANN VOLKER A (DE); GRUENTHAL GMBH (DE)) 7. März 2002 (2002-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	13, 14, 18-22, 24-27
A	—	15-17, 23
	—/—	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P\* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche  1. Juli 2004	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts  2. JUL 2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Huse, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/12413

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WARASHINA M ET AL: "Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome." CHEMISTRY & BIOLOGY. ENGLAND APR 1999, Bd. 6, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 237-250, XP002272987 ISSN: 1074-5521 das ganze Dokument	7
A	BEIGELMAN L ET AL: "CHEMICAL MODIFICATION OF HAMMERHEAD RIBOZYMES CATALYTIC ACTIVITY AND NUCLEASE RESISTANCE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 270, Nr. 43, 27. Oktober 1995 (1995-10-27), Seiten 25702-25708; XP000601905 ISSN: 0021-9258 Seite 25702, Absatz 4 Abbildung 1	1-12
P, X	SCHUBERT STEFFEN ET AL: "RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 15 OCT 2003, Bd. 31, Nr. 20, 15. Oktober 2003 (2003-10-15), Seiten 5982-5992, XP002272988 ISSN: 1362-4962 das ganze Dokument	1-14
P, X	GRÜNWELLER ARNOLD ET AL: "Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 15 JUN 2003, Bd. 31, Nr. 12, 15. Juni 2003 (2003-06-15), Seiten 3185-3193, XP002286510 ISSN: 1362-4962 Zusammenfassung Tabelle 1 Seite 3188, rechte Spalte, Zeile 16 - Zeile 20	15-20, 23
A	WO 02/44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE); LEN) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument	15-20, 23-27

-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/12413

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	NOVINA C D ET AL: "siRNA directed inhibition of HIV-1 infection" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 7, Nr. 8, Juli 2002 (2002-07), Seiten 681-686, XP002955298 ISSN: 1078-8956 Zusammenfassung Seite 681, rechte Spalte, Zeile 8 - Zeile 16 -----	15-20, 23-27
A	BRUMMELKAMP T R ET AL: "STABLE SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY VIRUS-MEDIATED RNA INTERFERENCE" CANCER CELL, XX, US, Bd. 2, Nr. 3, September 2002 (2002-09), Seiten 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 Zusammenfassung -----	15-20, 23-27

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/12413

### Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht-recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich:  
**Obwohl die Ansprüche 21–23, 26 und 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

### Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Fortsetzung von Feld I.1</p> <p>Obwohl die Ansprüche 21–23, 26 und 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12413

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0218407	A 07-03-2002	DE 10043674 A1 DE 10043702 A1 AU 9553101 A CA 2420656 A1 WO 0218407 A2 EP 1313768 A2 HU 0301805 A2 JP 2004507263 T US 2004002473 A1	21-03-2002 14-03-2002 13-03-2002 26-02-2003 07-03-2002 28-05-2003 28-08-2003 11-03-2004 01-01-2004
WO 0244321	A 06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A BR 0107536 A BR 0115814 A CA 2404890 A1 CA 2429814 A1 CZ 20031839 A3 WO 0244321 A2 EP 1309726 A2 EP 1407044 A2 HU 0302557 A2 JP 2003529374 T NO 20032464 A WO 0175164 A2 US 2003108923 A1 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 02-03-2004 23-03-2004 11-10-2001 06-06-2002 15-10-2003 06-06-2002 14-05-2003 14-04-2004 28-10-2003 07-10-2003 21-07-2003 11-10-2001 12-06-2003 04-07-2002

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**

THIS PAGE BLANK (USPTO)